

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Nives Kolesarić

TESTIRANJE NA HPV VISOKOG RIZIKA S PARCIJALNOM GENOTIPIZACIJOM U
DIJAGNOSTICI LEZIJA VRATA MATERNICE U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU
RIJEKA

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Nives Kolesarić

TESTIRANJE NA HPV VISOKOG RIZIKA S PARCIJALNOM GENOTIPIZACIJOM U
DIJAGNOSTICI LEZIJA VRATA MATERNICE U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU
RIJEKA

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Mentor rada:

Doc. dr. sc. Danijela Vrdoljak-Mozetič, dr. med

Diplomski rad ocijenjen je dana _____ u/na
_____ pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Senija Eminović, dr. med
2. doc. dr. sc. Dora Fučkar Čupić, dr. med
3. doc. dr. sc. Marko Klarić, dr. med

Rad sadrži 49 stranica, 10 slika, 17 tablica, 43 literaturnih navoda.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj obitelji na podršci, razumijevanju i vjeri u mene koju su imali tijekom cijelog mog školovanja.

Zahvaljujem i svojim prijateljicama, sada već i kolegicama, bez kojih bi fakultetski dani svakako izgledali drugačije.

Posebnu zahvalu upućujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Danijeli Vrdoljak-Mozetič, dr. med., na strpljenju, pruženom znanju, izdvojenom vremenu i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. HPV infekcija.....	1
1.2. Probir.....	5
1.3. Citologija.....	7
1.4. HPV testiranje.....	11
2. Svrha rada.....	14
3. Materijali i postupci.....	15
3.1. Citološka analiza.....	15
3.2. HPV testiranje.....	16
3.3. Statistička obrada.....	16
4. Rezultati.....	18
4.1. Rezultati HPV testiranja.....	19
4.2. Usporedba rezultata HPV testa i papa testa.....	20
4.3. Rezultati praćenja i ishoda.....	22
4.4. Rezultati prema dobi.....	30
4.5. Vrijednost papa i HPV testa.....	33
5. Rasprava.....	36
6. Zaključak.....	41
7. Sažetak.....	42
8. Summary.....	43
9. Literatura.....	44

Popis skraćenica i akronima

AIS - adenokarcinom *in situ* (lat. *adenocarcinoma in situ*)

AGC - atipične glandularne stanice (eng. *atypical glandular cells*)

ASC - atipične pločaste stanice (eng. *atypical squamous cell*)

ASC-H - atipične pločaste stanice - ne može se isključiti HSIL (eng. *Atypical squamous cells – cannot exclude HSIL*)

ASCUS - atipične pločaste stanice neodređena značenja (eng. *atypical squamous cell of undetermined significance*)

CIN - cervikalna intraepitelna neoplazija (eng. *cervical intraepithelial neoplasia*)

CIS - karcinom *in situ* (lat. *carcinoma in situ*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

HPV - humani papilomavirus (eng. *human papillomavirus*)

hrHPV - visoko-rizični HPV genotipovi (eng. *high-risk human papillomavirus*)

HSIL - skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja (eng. *high-grade squamous intraepithelial lesion*)

LBC - tekućinska citologija (eng. *liquid based cytology*)

LSIL - skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja (eng. *low-grade squamous intraepithelial lesion*)

OHR HPV - ostali visokorizični tipovi HPV-a (eng. *other high-risk HPV types - not 16/18*)

Papa test - citološki razmaz po Papanicolaou

RT-PCR - reverzna transkripcija lančane reakcije polimeraze (eng. *real-time polymerase chain reaction*)

SIL - skvamozna intraepitelna lezija (eng. *squamous intraepithelial lesion*)

TBS - Bethesda sustav (eng. *the Bethesda system*)

VCE obrisak - vaginalni, cervikalni, endocervikalni uzorak

1. Uvod

1.1. HPV infekcija

Humani papiloma virus (HPV) je pojam koji obuhvaća heterogenu skupinu DNA virusa koji inficiraju epitel sluznice i kože. Identificirano je nešto više od 200 različitih tipova, od čega 30 tipova može inficirati sluznicu anogenitalnog trakta. Na temelju povezanosti s razvojem raka vrata maternice i njegovih prekursora, dijelimo ih na visokorizične i niskorizične. Osim što se kod gotovo svih karcinoma vrata maternice može naći infekcija jednim od visokorizičnih tipova HPV-a, HPV je prisutan i kod 25% karcinoma usne šupljine, 85% karcinoma anusa, 90% karcinoma vagine te 40% karcinoma vulve.^{1,2}

1.1.1. Epidemiologija i transmisija

Infekcija HPV-om najčešća je spolno prenosiva bolest - preko 80% spolno aktivne populacije tijekom života imat će infekciju nekim od tipova HPV-a.³ Najznačajniji broj infekcija događa se unutar 10 godina od prvog spolnog odnosa. Detekcija virusa najveća je u mladih žena, osobito kod mlađih od 25 godina, a opada u starijim dobnim skupinama.⁴

Prijenos anogenitalne HPV infekcije moguć je pri svakoj vrsti spolnog odnosa. Za prijenos infekcije nije nužna penetracija pri spolnom odnosu, već je on moguć i kontaktom s kožom ili sluznicom perigenitalne regije. Vjerojatnost infekcije pri spolnom odnosu je velika, a moguća je i istovremena infekcija s više tipova HPV-a.⁵

1.1.2. Značaj perzistentne infekcije

Infekcija humanim papiloma virusom najčešće je prolazna i ne uzrokuje citološke abnormalnosti. Više od 90% infekcija prolazi unutar 2 godine, s prosjekom trajanja od 6 do 18

mjeseci. No, perzistentna infekcija visokorizičnim HPV-om čvrsto je povezana sa skvamoznom intraepitelnom lezijom visokog stupnja (HSIL) i primarni je čimbenik rizika za razvoj karcinoma vrata maternice. Zbog svoje središnje uloge u etiologiji gotovo svih slučajeva skvamoznog raka vrata maternice (99,7%), HPV se ispravno naziva nužnim, ali nedovoljnim uzrokom raka vrata maternice.⁵

Ukoliko i dođe do perzistentne infekcije, potpuna regresija je i dalje moguća, kao i daljnja progresija bolesti. Progresija do karcinoma vrata maternice najčešće traje godinama ili desetljećima, stoga je prosječna dob pojave displazije 29 godina, dok se karcinom vrata maternice najčešće javlja između 35. i 50. godine života.³

Ostali rizični čimbenici za razvoj karcinoma vrata maternice su dob, koitarhe, niski socioekonomski status, broj seksualnih partnera, oralna kontracepcija, visok paritet, prisutnost ostalih spolno prenosivih bolesti i pušenje, a rizik je povećan i kod imunosuprimiranih žena.⁶

1.1.3. Zona transformacije

Karcinom pločastih stanica najčešći je tip karcinoma vrata maternice s udjelom od 85-90%, nakon čega slijede adenokarcinomi s udjelom od 10-15%. Gotovo svi pločasti karcinomi vrata maternice nastaju unutar zone transformacije.

Površina egzocerviksa i vagine obložena je neurožnjelim višeslojnim pločastim epitelom, dok površinu endocerviksa oblaže jednoredni mucinozni cilindrični epitel. Mjesto gdje se ta dva epitela susreću naziva se skvamokolumnarna granica, čiji se smještaj tijekom života mijenja i ovisan je o hormonskoj stimulaciji. Prije puberteta i u menopauzi, skvamokolumnarna granica smještena je unutar cervikalnog kanala. Tijekom puberteta ona se pomiče prema egzocerviksu te zbog utjecaja niskog pH u rodnici dolazi do pločaste metaplazije, tj. zamjene cilindričnog epitela pločastim epitelom. Na taj način dolazi do stvaranja sekundarne skvamokolumnarne granice. Zona transformacije je područje između

originalne i sekundarne skvamokolumarne granice, a pokriva ju pločasti metaplastični epitel koji je najosjetljiviji na djelovanje onkogenih čimbenika.⁷

1.1.4. Imunogeneza i karcinogeneza HPV infekcije

Infekcija humanim papiloma virusom zahtijeva izloženost epidermalnih ili epitelnih stanica sluznice koje su još uvijek sposobne za proliferaciju, tj. nužna je izloženost stanica bazalnog sloja virusu. Izloženost stanica bazalnog sloja omogućuju mikrolezije kože ili sluznice, koje se najčešće događaju tijekom spolnog odnosa. Aktivna dioba stanica, koja se događa tijekom zacjeljivanja tih mikrolezija, neophodna je za ulazak virusnog genoma u jezgru stanica. Inficirana stanica se dijeli te se populacija stanica širi lateralno, a dio migrira u površnije slojeve sluznice, gdje se virusni geni aktiviraju, virusna DNA replicira, stvaraju proteini kapsida i potom virusne čestice koje se oslobađaju na površini te imaju mogućnost infekcije okolnog tkiva ili tkiva kontakta. HPV može inficirati i žljezdani epitel endocerviksa, što može rezultirati nastankom adenokarcinoma.^{1,8}

Ključni proteini u transformaciji i besmrtnosti inficiranih stanica su HPV onkogeni E6 i E7. Proteini E6 i E7 niskorizičnih i visokorizičnih tipova HPV-a imaju različite funkcije, što je temelj njihove različite biologije. Oznaka "E" označava da su ova dva gena izražena rano u životnom ciklusu HPV-a. Protein E6 se veže za tumorski supresor p53 u stanici domaćina te tako sprječava njenu apoptozu. Telomeraza se također aktivira, što dovodi do produživanja telomera i omogućivanja daljnje proliferacije stanica. Protein E7 se veže na tumorski retinoblastomski supresor gen (Rb), te inhibirajući njegovu funkciju pridonosi poremećaju staničnog ciklusa.^{5,8}

Stupanj ekspresije E6 i E7 u korelaciji je s vrstom cervikalne lezije. Kod lezija višeg stupnja HPV DNA je vjerojatnije integrirana u kromosome domaćina, što povećava

proliferaciju stanica, dok je u lezijama niskog stupnja HPV DNA prisutna u episomalnom obliku. ⁴

1.1.5. Razlike u genotipovima

Petnaest genotipova humanog papiloma virusa povezano je s povećanim rizikom od nastanka raka vrata maternice (tipovi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82) te se nazivaju HPV visokog rizika (hr-HPV). Učestalost detekcije pojedinih genotipova ovisi o geografskom položaju, histološkom tipu tumora i dobi. Rizik od progresije bolesti i raka ovisi o genotipu, ali usko povezani genotipovi mogu pokazivati različite patologije.

HPV 16 i HPV 18 uzrokuju više od 70% svih teških prekanceroza i slučajeva raka vrata maternice.³ Njihova prevalencija opada u starijim dobnim skupinama. HPV 16 nosi najveći rizik od perzistentne infekcije i prekanceroze, s apsolutnim rizikom od 40% tijekom 3-5 godina od infekcije, a uzrokom je oko polovice slučajeva raka vrata maternice.⁹ HPV 16 također uzrokuje većinu karcinoma povezanih s HPV-om u drugim anogenitalnim epitelima i u orofarinksu. ⁵ HPV 18 uzrokuje samo 8% lezija visokog stupnja, ali je povezan sa čak 38-50% AIS-a i 50% adenokarcinoma.¹⁰

Ostali hr-HPV tipovi također igraju značajnu ulogu, a pretpostavka je da će njihova relativna učestalost rasti zbog cijepljenja na tipove 16 i 18, iako su novija cjepiva polivalentna. Oni nose manji rizik od razvoja karcinoma, ali su čest uzrok pozitivnih HPV testova i abnormalnih citoloških nalaza. Stopa učestalosti tipova 16 i 18 raste s težinom lezije, a ostali hr-HPV tipovi su češće povezani s lezijama niskog stupnja. Od ostalih tipova HPV-a, najveći rizik od prekanceroze nose tipovi 31, 33, 35, 45.¹¹

1.2. Probir

Rak vrata maternice je malignom koji se najučinkovitije može prevenirati probirom. Zbog duge premaligne faze i anatomske područja koje je dostupno uzorkovanju, u većini slučajeva se može na vrijeme otkriti i uspješno liječiti. Incidencija raka vrata maternice varira od 2/100.000 do 75/100.000, ovisno o državi, a čak 85% slučajeva pojavljuje se u nerazvijenim zemljama u kojima još ne postoji kvalitetan program probira.¹² U Republici Hrvatskoj godišnje se otkrije oko 300 novih slučajeva raka vrata maternice, a od bolesti godišnje umire oko 100 žena. Najveći broj slučajeva javlja se u srednjoj životnoj dobi, dakle kod žena koje su još radno aktivne i koje skrbe o svojoj obitelji, što predstavlja i društveno opterećenje.¹³

U Republici Hrvatskoj trenutno se provodi oportunistički probir raka vrata maternice, što znači da se on obavlja na zahtjev pojedinca prema preporuci specijalista ginekologije, najčešće unutar primarne zdravstvene zaštite.¹⁴ Nedostaci takvog pristupa su preučestalo testiranje dijela populacije s istovremenim niskim obuhvatom nekih skupina, osobito onih slabijeg socioekonomskog statusa.¹⁵

U okviru organiziranog probira, preporučuje se da ciljna skupina za probir budu sve žene starije od 25, a mlađe od 65 godina, što u Republici Hrvatskoj obuhvaća oko 1 200 000 žena, a preporučeni interval probira papa testom je svake 3 godine.¹³ Međutim, kod oportunističkog probira optimalno je započeti probir već kod žena starih 20 godina, s obzirom da se već u toj dobi može pojaviti CIS, ali i nastaviti testirati žene starije od 65 godina jer je pojava karcinoma moguća i u starijim dobnim skupinama.^{16,17}

U Republici Hrvatskoj se za probir najčešće koristi konvencionalna citologija po Papanicolaou. Dokazano je da se 80% karcinoma vrata maternice može spriječiti dobro organiziranim, visokokvalitetnim programima probira pomoću papa testa s tri do pet godina

intervala probira. Cilj je probirom obuhvatiti minimalno 85% ciljne populacije, a mortalitet od raka vrata maternice smanjiti za 80%.¹⁸

Prema europskim smjernicama za osiguranje kvalitete probira raka vrata maternice, članice Europske unije mogu koristiti citologiju ili HPV test kao primarni test probira, dok kotestiranje nije preporučeno. Unatoč preporuci, pojedine članice Europske unije uvele su kotestiranje kao primarni oblik probira.¹⁹

1.3. Citologija

U razvijenim zemljama smanjenje incidencije i smrtnosti od raka vrata maternice pripisuje se uvođenju raširenog probira za prekursore raka vrata maternice. U Republici Hrvatskoj program ranog otkrivanja raka vrata maternice počiva na papa testu, kojeg je u ginekološku praksu 1943. godine uveo George Papanicolaou. Papa test ima značajke koje bi idealan test probira trebao imati - prihvatljiv trošak, jednostavnost primjene, minimalnu neugodnost za pacijenta, neinvazivnost, zadovoljavajuću osjetljivost i specifičnost te mogućnost otkrivanja bolesti u stadiju u kojem je moguće uspješno liječenje.²⁰

Najveći nedostatak papa testa je znatan broj lažno negativnih rezultata, što je često posljedica greške u uzorkovanju.⁶ Osim konvencionalne citologije, moguće je primijeniti i tekućinsku citologiju. Iako je osjetljivost tekućinske citologije slična osjetljivosti konvencionalne citologije, udio nezadovoljavajućih uzoraka je manji. Reprezentativnost uzorka kod tekućinske citologije raste upravo zbog smanjenog negativnog efekta sluzi, leukocita i krvi. Trošak LBC testa je veći, no na istom uzorku mogu se provesti molekularni testovi, osobito HPV testiranje i dodatne imunocitokemijske analize staničnih biljega, a smanjuje se i učestalost ponavljanja konvencionalne citologije zbog nezadovoljavajućag uzorka.¹⁵

Ispravno uzeti uzorak značajno doprinosi dijagnostičkoj vrijednosti Papa testa.¹⁵ Uzimanje uzorka potrebno je učiniti nakon inspekcije vrata maternice u spekulima, a prije bimanualnog ginekološkog pregleda. Standardna tehnika za uzimanje papa testa obuhvaća uzimanje uzorka stanica s epitela stražnjeg svoda vagine, vanjskog ušća cerviksa te endocervikalnog kanala. Prekanceroze se uglavnom javljaju u zoni transformacije, stoga je veoma važno da je stanični materijal uzorkovan u ovoj zoni. Uzorak sa stražnjeg svoda vagine i vanjskog ušća cerviksa najčešće se uzima Ayerovom špatulom, dok se uzorak endocervikalnog kanala uzima endocervikalnom četkicom. Tim redoslijedom uzorci se

prenose i razmazuju po predmetnom stakalcu, nakon čega slijedi brza fiksacija (95%-tnim etanolom ili citosprejem). Na taj način dobiva se VCE obrisak - na jednom stakalcu dobivaju se stanice iz vagine (V), cerviksa (C) te endocerviksa (E).²⁰ U slučaju tekućinske citologije (LBC), uzorak se uzima na isti način, ali se pritom preporučuje korištenje špatula ili četkica od plastičnih materijala, koji se potom sa staničnim materijalom uranjaju u posudicu s posebnim tekućim transportnim medijem. Menstruacija, upala ili infekcija rodnice, spolni odnos unutar 24h od uzimanja uzorka, radioterapija, menopauza, trudnoća i rano postpartalno razdoblje mogu negativno utjecati na kvalitetu uzorka.¹⁵

Iako papa test nije test probira za karcinom endometrija, čak u 30-50% slučajeva postoji prisutnost abnormalnih stanica.²¹ Papa testom moguće je u rijetkim slučajevima otkriti i neke druge malignome. Također, u papa testu mogu se detektirati upale, reaktivne promjene, poremećaj mikroflore i sl.²²

1.3.1. "Bethesda" klasifikacija citologije vrata maternice

Klasifikacija abnormalnih nalaza papa testa počiva na „Bethesda sustavu”.

Bethesda sustav (TBS) je sustav za izvještavanje o cervikalnim ili vaginalnim citološkim dijagnozama, koji se koristi kao jedinstvena terminologija za nalaze papa testa. Predstavljen je 1988. godine, a revizije TBS objavljene su 1991., 2001. te 2014. godine. U Hrvatskoj se još od 2001. godine koristi prilagođena terminologija prema uzoru na Bethesda sustav, a trenutačno je na snazi jedinstveni obrazac nalaza citologije vrata maternice „Zagreb 2016“.^{23,24,25}

Cilj Bethesda sustava je uvođenje terminologije:

- koja je jedinstvena
- koja će odražavati najnovija razumijevanja cervikalne neoplazije
- iz koje će proizlaziti jasne preporuke za kliničke postupke²³

Abnormalni rezultati obuhvaćaju patologiju porijekla pločastih i žljezdanih stanica.

Pločaste abnormalnosti uključuju:

- atipične pločaste stanice
 - neodređenog značenja (ASC-US)
 - ne može se isključiti HSIL (ASC-H)
- skvamoznu intraepitelnu leziju niskog stupnja (LSIL)
- skvamoznu intraepitelnu leziju visokog stupnja (HSIL)
- karcinom skvamoznih stanica (SCC)²²

ASCUS je definiran citološkim promjenama koje sugeriraju LSIL, ali kriteriji nisu zadovoljeni u potpunosti, dok ASC-H ukazuje na promjene koje mogu upućivati na HSIL, pa čak i na karcinom, ali ne zadovoljavaju sve kriterije za HSIL ili karcinom ili je nalaz abnormalnih stanica oskudan. Atipične pločaste stanice najčešća su patološka interpretacija papa testa, od čega ASCUS čini 60-90% nalaza u ovoj skupini. Prevalencija ASCUS-a češća je u mlađim dobnim skupinama i opada s godinama. Osim što ASCUS i ASC-H mogu upućivati na promjene uzrokovane onkogenim HPV genotipom, često su posljedica upale, atrofije s degeneracijom, hormonskih promjena, artefakta i sl. Najveći dio nalaza HSIL-a detektiran je upravo tijekom praćenja ASC-a, no rizik od HSIL-a i karcinoma ovisi i o HPV statusu. ^{22,26}

5-godišnji rizik od HSIL-a iznosi:

- 1,1% kod ASCUS-a s negativnim nalazom HPV testa
- 18% kod ASCUS-a s pozitivnim nalazom HPV testom
- 12% kod ASC-H s negativnim nalazom HPV testa
- 45% kod ASC-H s pozitivnim nalazom HPV testom²²

Kod adolescentica s nalazom ASCUS-a potrebno je ponoviti papa test za 12 mjeseci. Ukoliko nalaz ponovno ukazuje na ASCUS ili neki veći stupanj patologije, pacijenticu je potrebno uputiti na kolposkopiju.

U ostalih žena papa test je potrebno ponoviti za 6 mjeseci, a ukoliko nalaz opet ukazuje na ASCUS ili neki veći stupanj patologije, pacijenticu je potrebno uputiti na kolposkopiju. Alternativa papa testu nakon 6 mjeseci je refleksno HPV testiranje. U slučaju pozitivnog HPV testa, pacijenticu treba uputiti na kolposkopiju, a ukoliko je HPV test negativan, pacijenticu je potrebno konzervativno pratiti.

Pacijentice s nalazom ASC-H treba uputiti na kolposkopiju bez obzira na HPV status.²⁷

1.3.1.1. SIL (skvamozne intraepitelne lezije)

1988. godine uveden je dvostupanjski sustav klasifikacije skvamoznih intraepitelnih lezija (SIL) - SIL niskog stupnja (LSIL) i SIL visokog stupnja (HSIL).²³

LSIL obuhvaća promjene povezane s infekcijom HPV-a koje odgovaraju blagoj displaziji i cervikalnoj intraepitelnoj neoplaziji prvog stupnja (CIN I). Citološke promjene kod LSIL-a se najjasnije iskazuju kao koilocitoza.^{23,26} U odnosu na HSIL pokazuje višu stopu spontane regresije. Stopa spontane regresije iznosi 60-80%, a osobito je visoka u mlađim dobnim skupinama.²⁸

U adolescentica mlađih od 20 godina s nalazom LSIL-a papa test treba ponoviti za 12 mjeseci, a kod pacijentica u dobi 20-24 godine potrebno je učiniti papa test za 6 i 12 mjeseci ili HPV-HR test za 12 mjeseci. Pacijentice starije od 24 godine potrebno je uputiti na kolposkopiju.²⁷

HSIL obuhvaća citološke promjene koje odgovaraju CIN-u II ili umjerenoj displaziji, CIN-u III ili teškoj displaziji i karcinomu in situ te sumnju na početnu invaziju. Stopa HSIL-a

iznosi oko 0,5%.^{23,26} Sve pacijentice s nalazom HSIL-a potrebno je uputiti na kolposkopiju, bez obzira na njihov HPV status.²⁷

1.3.1.2. Glandularne lezije

Glandularne lezije manje su čest nalaz nego lezije pločastih stanica, no teže ih je otkriti citološkim probirom i kolposkopijom. Dijele se u tri grupe: atipične glandularne stanice (AGC), adenokarcinom in situ (AIS) te adenokarcinom. Porijeklo cilindričnog epitela može biti endocervikalno, endometralno, ekstrauterino ili neodređeno, što je potrebno navesti u nalazu.²³

Osim što je glandularne lezije teže otkriti citološkim probirom, glandularne promjene se često javljaju i kod žena s negativnim HPV statusom. Iako su adenokarcinomi vrata maternice također povezani s humanim papilloma virusom, korelacija je slabije izražena i ovisna je o dobi. Kod žena mlađih od 40 godina, HPV je prisutan kod nešto manje od 90% slučajeva adenokarcinoma, a kod žena starijih od 60 godina u samo 40-45% slučajeva. Iz tog razloga, u državama s dobro provedenim programom probira raste udio adenokarcinoma.²⁹

1.4. HPV testiranje

S obzirom na etiološku vezu između infekcije humanim papiloma virusom i karcinogeneze vrata maternice, danas sve veći broj država zamjenjuje citologiju vrata maternice molekularnim testiranjem na HPV, osobito države s visokim BDP-om.¹⁸

Uzimajući u obzir da se HPV ne može uzgajati u konvencionalnim staničnim kulturama, a serološki testovi imaju samo ograničenu osjetljivost, dijagnoza HPV infekcije zahtijeva otkrivanje njegovog genoma u staničnim uzorcima.³⁰ Postupak uzimanja uzorka sličan je onom kod konvencionalne citologije, a za uzorkovanje se koristi četkica (engl.

cytobrush) ili metlica. U pojedinim državama moguć je i *self-sampling* koji pridonosi većem broju žena koje su obuhvaćene probirom, a također pokazuje visoku osjetljivost.³¹

Metode molekularne biologije koje se najčešće koriste za detekciju HPV-a su RT-PCR ili testovi koji se zasnivaju na hibridizaciji probe RNA sa ciljnom DNA. Napredne molekularne metode za identifikaciju humanog papiloma virusa omogućuju preciznu razliku između pojedinih genotipova HPV-a.³² Rezultati se najčešće prikazuju kao pozitivni ili negativni na HPV 16 i HPV 18 pojedinačno te na ostale visokorizične HPV genotipove skupno, što se naziva parcijalna genotipizacija. Parcijalna genotipizacija je važna kao trijaža kod lakših citoloških abnormalnosti u zemljama u kojima se probir zasniva na citologiji.

Smatra se da HPV testiranje ima veću osjetljivost od konvencionalnog citološkog testiranja. Iako će se HPV testiranjem otkriti više prekursorskih lezija nego standardnim papa testom, zbog niske specifičnosti i mnogih prolaznih lezija, može doći do nepotrebnog liječenja, nepotrebnih dodatnih pretraga i anksioznosti, stoga HPV test kao primarni test nije preporučen kod žena mlađih od 30 godina.¹⁹

HPV testiranje provodi se kroz tri modela:

1. Kao trijažni test za žene s abnormalnim citološkim nalazom, najčešće nakon nalaza ASCUS-a kod žena starijih od 25 godina, kod nalaza LSIL-a kod žena starijih od 30 godina te kod nalaza AGC-a endocervikalnog ili neodređenog porijekla.
2. Kao test praćenja nakon liječenja SIL-a viskog stupnja, zajedno s papa testom 6 mjeseci nakon zahvata.
3. Kao primarni test probira, samostalno (u žena starijih od 30 godina) ili u kombinaciji s papa testom (kotestiranje). HPV testiranje kao samostalan primarni test probira preporučeno je koristiti samo kog organiziranog tipa probira.¹⁹

Interval probira nakon negativnog HPV testa može se produljiti na 5 godina, a ovisno o dobi i prethodnim nalazima, prema nekim studijama može iznositi i do 10 godina.¹⁹ Prema smjericama Američkog društva za kolposkopiju i cervikalnu patologiju žene pozitivne na HPV 16 ili HPV 18 potrebno je uputiti na kolposkopiju, ali obavezno uz istovremeno očitavanje nalaza citologije. Kod žena koje su pozitivne na ostale tipove HPV-a, najprije se očitava papa test, a ukoliko nalaz refleksnog papa testa ukazuje na ASC-US ili neki veći stupanj patologije, ženu treba uputiti na kolposkopiju. Ukoliko je refleksni papa test negativan, potrebno je praćenje kotestiranjem nakon 12 mjeseci.³³

2. Svrha rada

Svrha ovog rada je istražiti povezanost nalaza humanog papiloma virusa testiranjem na HPV 16 genotip, HPV 18 genotip te na grupu ostalih visokorizičnih HPV genotipova s citološkim nalazom papa testa žena koje sudjeluju u probiru, obradi i praćenju lezija vrata maternice. Osim korelacije HPV i papa nalaza, cilj je usporediti i podatke prema dobnim skupinama te podatke o praćenju i ishodu bolesti.

3. Materijali i postupci

U istraživanje su bile uključene pacijentice čiji su testovi na HPV visokog rizika i papa testovi obrađeni u Kliničkom bolničkom centru Rijeka u periodu od 6. svibnja 2019. godine do 2. veljače 2021. godine. Istraživanje je bilo retrospektivno, a podaci su se prikupljali iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Rijeka te elektroničke baze podataka ustanove - „IBIS“, nakon čega su se nalazi HPV testiranja uspoređivali s papa testovima pacijentica.

Indikacije za HPV testiranje su obuhvaćale probir, abnormalni nalaz papa testa unutar tri godine, abnormalni nalaz papa testa stariji od 3 godine te praćenje nakon terapijskih zahvata na vratu maternice. Kod dijela pacijentica uzorak za HPV testiranje uzet je samostalno te se kod tih žena HPV test uspoređivao s najbližim papa testom, dok se kod ostalih žena radilo o istovremenom uzimanju papa i HPV testa, odnosno kotestiranju. Iako nekolicina žena nije imala papa test ili je HPV test bio invalidan, njihovi dostupni podaci su bili uključeni u istraživanje. Praćenje i ishod analiziranih nalaza podijeljeno je u grupe: nema praćenja, negativan ishod što uključuje negativan jedan ili više papa testova i/ili negativan HPV test, abnormalan ishod, ali manji od citološkog nalaza HSIL (<HSIL), te abnormalan ishod HSIL ili više (HSIL+). Praćenje je trajalo od 1 do 18 mjeseci.

3.1. Citološka analiza

Citološki uzorci konvencionalne citologije zaprimljeni iz ambulanti primarne zdravstvene zaštite žena, bolničkih i privatnih ambulanti očitani su pomoću svjetlosnog mikroskopa i nalaz je izdan prema klasifikaciji „Zagreb 2016“. Nalazi se dijele na negativan nalaz na intraepitelnu ili invazivnu leziju (negativan), ASCUS, ASC-H, LSIL, HSIL+ koji uključuje i karcinom, te grupu AGC/AIS/adenokarcinom.

3.2. HPV testiranje

Za HPV testiranje korišten je Cobas 4800 sustav (Roche, Švicarska). Cobas 4800 bazira se na PCR metodi, a dizajniran je za istovremeno otkrivanje ukupno 14 vrsta hr-HPV-a iz jednog uzorka: HPV 16 pojedinačno, HPV 18 pojedinačno i 12 skupnih genotipova visokog rizika (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 i 68) koji se nazivaju ostalim visokorizičnim HPV tipovima (OHR).

Sustav se sastoji od 3 dijela:

- računala (software)
- Cobas x480 aparata, čija funkcija je priprema uzorka i izolacija DNA
- Cobas z480 analizatora, koji služi za amplifikaciju i detekciju DNA³⁵

Za test je potreban 1 ml tekućeg citološkog uzorka. Cobas 4800 istovremeno testira DNA humanog beta-globina kao unutarnju kontrolu uzorka, što umanjuje stopu lažno negativnih rezultata. Test je gotovo u potpunosti automatiziran i standardiziran te onemogućava subjektivnu prilagodbu i interpretaciju nalaza.³⁶

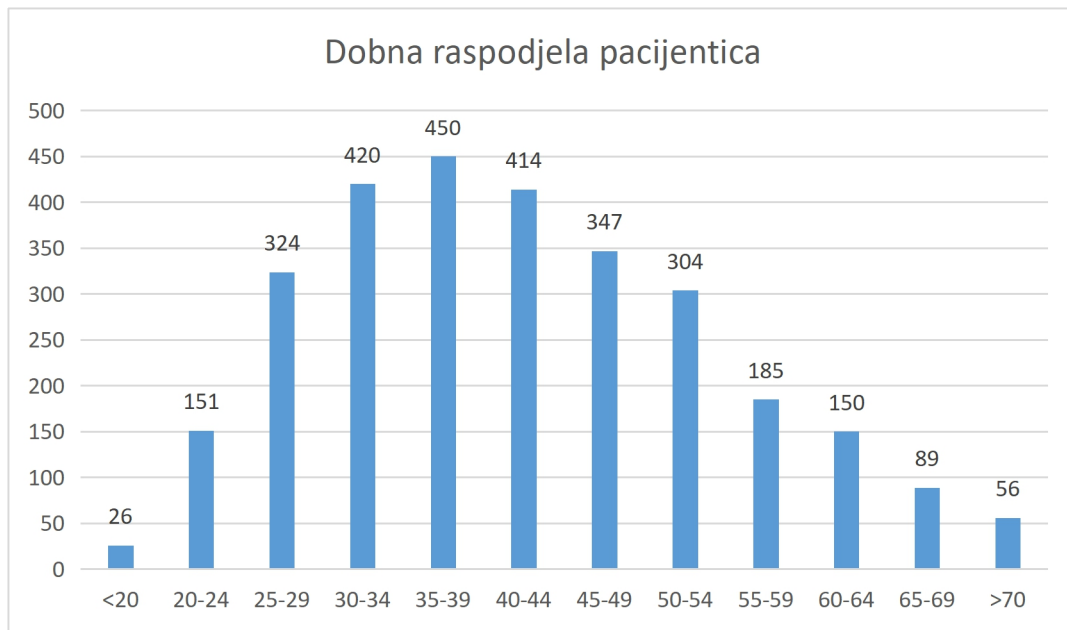
3.3. Statistička obrada

Statistički će se usporediti citološke grupe nalaza koje imaju definiran negativan ishod s ishodom HSIL i više kao i razlike u učestalosti HPV pozitiviteta ovisno o dobnim skupinama. U slučaju ishoda s abnormalnim nalazom, ali nižim od HSIL praćenje bi trebalo biti dugotrajnije kako bi se mogao definirati pravi ishod te je ta kategorija isključena iz statističke obrade. Korišten je Hi-kvadrat test za usporedbu frekvencija, statistička značajnost definirana je na razini $P=0,05$. Prema ishodu, izračunate su osjetljivost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrijednost (PPV), negativna prediktivna vrijednost (NPV) i dijagnostička točnost (DT) za papa test, HPV test i njihove kombinacije. Statistička obrada napravljena je pomoću

MedCalc Software Ltd, Belgija.

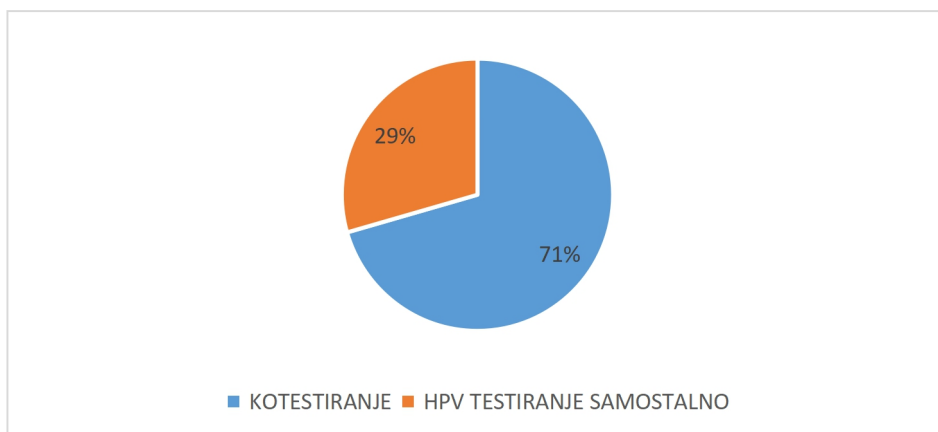
4. Rezultati

Istraživanje uključuje 2916 pacijentica, raspona dobi od 16 do 84 godine starosti, a dobna raspodjela prikazana je na slici 1.



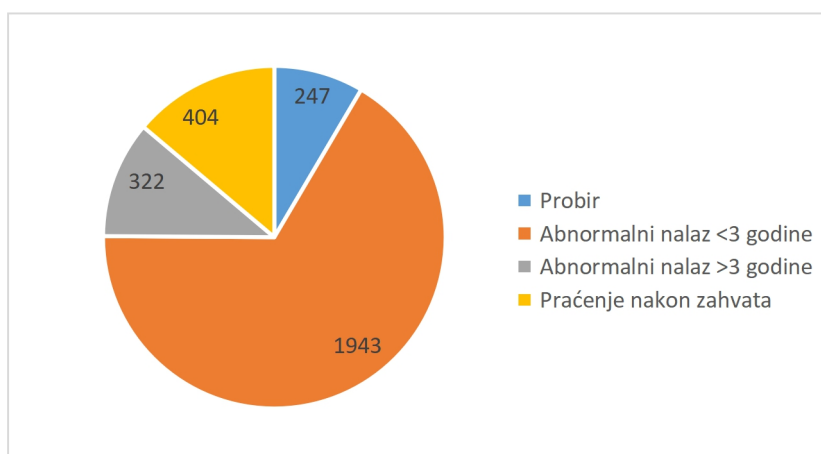
Slika 1. Dobna raspodjela pacijentica

U 70,54% slučajeva (N=2057) pacijentice su podvrgnute kotestiranju, dok je u 29,46% slučajeva (N= 859) uzorak za HPV testiranje uzet samostalno, nakon papa testa, što je prikazano na slici 2.



Slika 2. HPV test uzet kao kotestiranje i samostalno

Indikacije za HPV testiranje su u 8,47% (N= 247) slučajeva bile probir, abnormalni nalaz papa testa unutar 3 godine u 66,63% (N=1943), abnormalni nalaz papa testa stariji od 3 godine u 11,04% (N=322) te praćenje nakon zahvata u 13,86% slučajeva (N=404), što je prikazano na slici 3.



Slika 3. Indikacije za HPV testiranje

4.1. Rezultati HPV testiranja

67,97% pacijentica (N=1982) imalo je negativan HPV test.

Od pozitivnih nalaza, najzastupljeniji su bili ostali visokorizični tipovi HPV-a (OHR HPV) s udjelom od 21,23% (N=619); potom slijede HPV 16 koji je nađen u 4,66% slučajeva (N=136) i HPV 18 u 1,68% (N=49), a 3,6% pacijentica (N=105) imalo je infekciju s više tipova HPV-a.

Najčešća koinfekcija je bila infekcija HPV-om tipa 16 i ostalim tipovima HPV-a, što je bio slučaj kod 2,57% žena (N=75). Potom slijede infekcije tipom 18 i OHR u 0,79% slučajeva (N=23), tipom 16 i tipom 18 u 0,14% (N=4) te istovremena infekcija tipom 16, 18 i nekim od ostalih visokorizičnih tipova u 0,1% slučajeva (N=3). 0,86% (N=25) pacijentica je imalo invalidan HPV test. Podatci su prikazani u tablici 1.

REZULTATI HPV TESTIRANJA	N	UDIO
HPV NEG	1982	67,97%
HPV 16	136	4.66%
HPV 18	49	1.68%
OHR HPV	619	21.23%
HPV 16 + OHR HPV	75	2.57%
HPV 18 + OHR HPV	23	0.79%
HPV 16 + HPV 18	4	0.14%
HPV 16 + HPV 18 + OHR HPV	3	0.10%
INVALID TEST	25	0.86%
Ukupno	2916	100.00%

Tablica 1. Rezultati HPV testiranja

4.2. Usporedba rezultata HPV testa i papa testa

Kod negativnog papa testa HPV test je bio negativan u 91,23% (N=1466) slučajeva, OHR HPV bio je prisutan u 6,53% (N=105) slučajeva, HPV 16 u 0,56% (N=9), HPV 18 u 0,31% (N=5), HPV 16 + OHR u 0,37% (N=6), HPV 18 + OHR HPV u 0,12% (N=2) te HPV 16, HPV 18 i OHR HPV u 0,06% (N=1) slučajeva, dok je HPV test u 0,81% (N=13) slučajeva bio invalidan.

Kod nalaza ASCUS-a, HPV test je bio negativan u 58,04% (N=379) slučajeva, OHR HPV nađen je u 29,86% (N=195) slučajeva, HPV 16 u 4,9% (N=32), HPV 18 u 2,14% (N=14), HPV 16 + OHR HPV u 2,76% (N=18), HPV 18 + OHR HPV u 0,46% (N=3), HPV 16 + HPV 18 u 0,31% (N=2) te HPV 16 + HPV 18 + OHR HPV u 0,15% (N=1), a HPV test je bio invalidan u 1,38% (N=9) slučajeva.

Kod nalaza LSIL, HPV test je bio negativan u 24,47% (N=70) slučajeva, OHR HPV bio je prisutan u 54,2% (N=155) slučajeva, HPV 16 u 7,69% (N=22), HPV 18 u 4,2% (N=12), HPV 16 + OHR u 5,59% (N=16), HPV 18 + OHR HPV u 2,8% (N=8) te HPV 16, HPV 18 i OHR HPV u 0,35% (N=1) slučajeva, dok je HPV test u 0,7% (N=2) slučajeva bio invalidan.

U skupini papa testova s nalazom ASC-H i HSIL+, negativan HPV test nađen je u 10,28% (N=33) slučajeva, OHR HPV u 47,66% (N=153), HPV 16 u 22,74% (N=73), HPV 18 u 4,67% (N=15), HPV 16 + OHR HPV u 10,59% (N=34), HPV 18 + OHR HPV u 3,12% (N=10), HPV 16 + HPV 18 u 0,62% (N=2), a HPV test je bio invalidan u 0,31% (N=1) slučajeva.

Uz nalaz AGC/AIS/adenokarcinom nađeno je 67% HPV negativnih testova (N=16), HPV 18 u 13 % slučajeva (N=3), OHR HPV u 13% (N=3), te HPV 16 + OHR HPV u 4% (N=1) i HPV 18 + OHR HPV u 4% (N=1), dok nije bilo niti jednog slučaja HPV 16.

Svi podatci prikazani su u tablici 2.

	papa NEG		ASCUS		LSIL		ASC-H + HSIL+		AGC+AIS+ adenokarcinom	
	N	UDIO %	N	UDIO %	N	UDIO %	N	UDIO %	N	UDIO %
HPV NEG	1466	91.23 %	379	58.04%	70	24.47%	33	10.28%	16	67%
HPV 16	9	0.56%	32	4.9%	22	7.69%	73	22.74%	0	0%
HPV 18	5	0.31%	14	2.14%	12	4.2%	15	4.67%	3	13%
OHR HPV	105	6.53%	195	29.86%	155	54.2%	153	47.66%	3	13%
HPV 16 + OHR HPV	6	0.37%	18	2.76%	16	5.59%	34	10.59%	1	4%
HPV 18 + OHR HPV	2	0.12%	3	0.46%	8	2.8%	10	3.12%	1	4%
HPV 16 + HPV 18	0	0%	2	0.31%	0	0%	2	0.62%	0	0%
HPV 16 + HPV 18 + OHR HPV	1	0.06%	1	0.15%	1	0.35%	0	0%	0	0%
INVALID TEST	13	0.81%	9	1.38%	2	0.7%	1	0.31%	0	0%
Ukupno	1607	100%	653	100%	286	100%	321	100%	24	100%

Tablica 2. Nalazi HPV testa u odnosu na citološke nalaze papa testa

U grupi negativnog papa testa kada se isključe invalidni nalazi, nađeno je 91,97% HPV negativnih nalaza, kod 0,44% nađeni su HPV 16 + 18, a u 6,59 % pozitivan OHR. U grupi ASCUS+LSIL kada se isključe invalidni nalazi, nađeno je 48,38% HPV negativnih nalaza, kod 13,90% nađeni su HPV 16 + 18, a u 37,72 % pozitivan OHR. U grupi ASC-H+HSIL+ kada se isključe invalidni nalazi, nađeno je 10,31% HPV negativnih nalaza, kod 41,88% nađeni su HPV 16 + 18, a u 47,81 % pozitivan OHR. U grupi negativnog papa testa, učestalost HPV negativnog nalaza statistički je značajno veća u usporedbi s grupom ASCUS+LSIL ($\chi^2 = 609,551$; $P < 0,0001$) i s grupom ASC-H+HSIL+ ($\chi^2 = 1045,966$; $P < 0,0001$), a u grupi ASCUS+LSIL nađeno je statistički značajno više HPV negativnih nalaza u odnosu na grupu ASC-H+HSIL+ ($\chi^2 = 145,368$; $P < 0,0001$). U grupi negativnog papa testa, učestalost HPV 16+18 statistički je značajno manja u usporedbi s grupom ASCUS+LSIL ($\chi^2 = 208,196$; $P < 0,0001$) i s grupom ASC-H+HSIL+ ($\chi^2 = 670,164$; $P < 0,0001$), a u grupi ASCUS+LSIL nađeno je statistički značajno manje HPV 16+18 nalaza u odnosu na grupu ASC-H+HSIL+ ($\chi^2 = 111,907$; $P < 0,0001$). U grupi negativnog papa testa, učestalost HPV OHR statistički je značajno manja u usporedbi s grupom ASCUS+LSIL ($\chi^2 = 384,195$; $P < 0,0001$) i s grupom ASC-H+HSIL+ ($\chi^2 =$; $P < 0,0001$), a u grupi ASCUS+LSIL nađeno je statistički značajno manje HPV OHR nalaza u odnosu na grupu ASC-H+HSIL+ ($\chi^2 = 10,060$; $P = 0,0015$).

4.3. Rezultati praćenja i ishoda

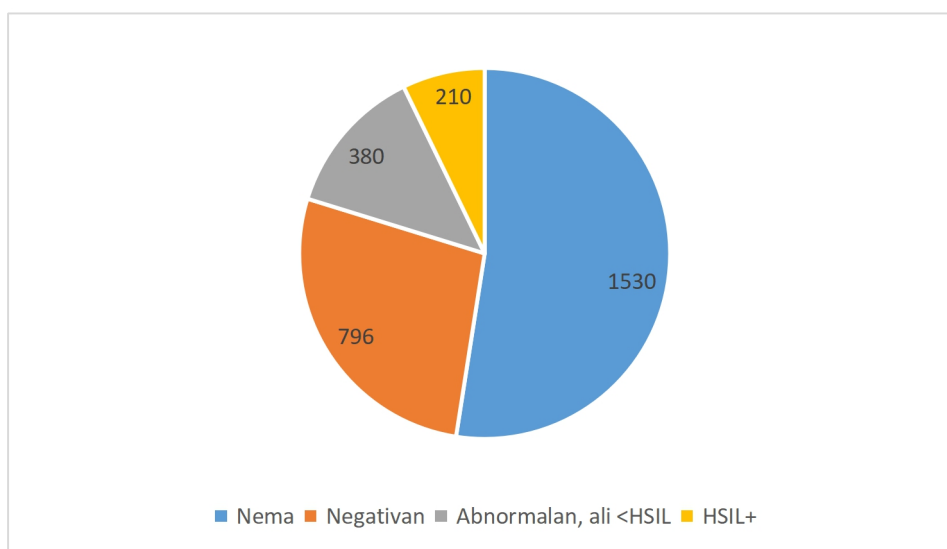
52,47% žena (N=1530) nije imalo praćenje.

27,3% pacijentica (N=796) imalo je negativan ishod, 13,03% (N=380) abnormalni nalaz <HSIL, a 7,2% (N=210) žena imalo je nalaz HSIL+. Podatci su prikazani u tablici 3 te na slici

4.

PRAĆENJE	N	UDIO
Nema	1530	52.47%
Negativan	796	27.30%
Abnormalan, ali <HSIL	380	13.03%
HSIL+	210	7.20%

Tablica 3. Rezultati praćenja



Slika 4. Rezultati praćenja

U grupi negativan papa HR HPV pozitivan zabilježen je HSIL+ ishod u 2,34 % slučajeva u usporedbi s grupom negativan papa HR HPV negativan gdje nije zabilježen nijedan HSIL+ ishod, a razlika je statistički značajna ($\chi^2 = 34,347$; $P < 0,0001$).

Iako u većini slučajeva negativnog papa testa nije bilo rezultata praćenja, negativan ishod zabilježen je u 31,25 % slučajeva u negativan papa HR HPV pozitivnoj grupi, a u gotovo jednakom udjelu od 31,17% slučajeva u negativan papa HR HPV negativnoj grupi ($\chi^2 = 0,000$; $P < 0,9851$).

S druge strane, abnormalan nalaz u praćenju, ali niži od HSIL-a, u grupi negativan papa HR HPV pozitivan može predstavljati klinički važan podatak. Nađen je u većem postotku (25%) u odnosu na grupu negativan papa HR HPV negativan (1,77%), a razlika je statistički značajna ($\chi^2 = 181,223$; $P < 0,0001$).

U grupi negativan papa HR HPV pozitivan (N=128), u podgrupi s pozitivnim 16 i 18 genotipom (N=23) ishod HSIL+ zabilježen je u jednom (4,35 %) slučaju, a u podgrupi s OHR (N=105) u dva (1,9 %) slučaja, a ta razlika nije statistički značajna ($\chi^2 = 0,492$; $P=0,4832$).

Podatci su prikazani u tablici 4.

	NEMA PRAĆENJA		NEGATIVAN		ABNORMALAN, ALI <HSIL		HSIL ILI VIŠE		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
PAPA NEG, HPV POZ	53	41.41%	40	31.25%	32	25%	3	2.34%	128
PAPA NEG, HPV NEG	983	67.05%	457	31.17%	26	1.77%	0	0%	1466
PAPA NEG, HPV 16	4	44.44%	2	22.22%	3	33.33%	0	0%	9
PAPA NEG, HPV 18	3	60%	0	0%	1	20%	1	20%	5
PAPA NEG, OHR	43	41.0%	35	33.33%	25	23.81%	2	1.9%	105
PAPA NEG, HPV 16 + OHR	2	33.33%	3	50%	1	16.67%	0	0%	6
PAPA NEG, HPV 18 + OHR	0	0%	0	0%	2	100%	0	0%	2
PAPA NEG, HPV 16 + HPV 18	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
PAPA NEG, 16+18+OHR	1	100%	0	0%	0	0%	0	+0%	1
PAPA NEG, INVALID	2	15.38%	11	84.62%	0	0%	0	0%	13

Tablica 4. Rezultati praćenja nakon negativnog nalaza papa testa ovisno o nalazu HPV testa

U grupi ASCUS HR HPV pozitivan zabilježen je HSIL+ ishod u 7,55 % slučajeva što je statistički značajno više u usporedbi s grupom ASCUS HR HPV negativan s ishodom HSIL+ u 0,26 % slučajeva ($\chi^2 = 26,241$; $P=0,0001$).

Negativan ishod zabilježen je u statistički značajno nižem postotku (16,98 %) u ASCUS HR HPV pozitivnoj grupi u odnosu na ASCUS HR HPV negativnu grupu (40,63 %), ($\chi^2 = 40,791$; $P=0,0001$).

U grupi ASCUS HR HPV pozitivan, u podgrupi ASCUS s pozitivnim 16 i 18 genotipom (N=70) ishod HSIL+ zabilježen je u 8 (11,43 %) slučajeva, a u podgrupi s OHR (N=195) u 12 (6,15 %) slučajeva. Uočena razlika nije statistički značajna ($\chi^2 = 2,051$; $P=0,1521$).

Podatci su prikazani u tablici 5.

	NEMA PRAĆENJA		NEGATIVAN		ABNORMALAN ALI <HSIL		HSIL ILI VIŠE		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
ASCUS HR HPV POZ	103	38.87%	45	16.98%	97	36.60%	20	7.55%	265
ASCUS HR HPV NEG	188	49.60%	154	40.63%	36	9.50%	1	0.26%	379
ASCUS HPV 16	15	46.88%	6	18.75%	9	28.13%	2	6.25%	32
ASCUS HPV 18	4	23.08%	2	15.38%	7	53.85%	1	7.69%	14
ASCUS OHR	76	38.97%	37	18.97%	70	35.90%	12	6.15%	195
ASCUS HPV 16 + OHR	5	27.78%	0	0%	9	50%	4	22.22%	18
ASCUS HPV 18 + OHR	1	33.33%	0	0%	1	33.33%	1	33.33%	3
ASCUS HPV 16 + HPV 18	1	50%	0	0%	1	50%	0	0%	2
ASCUS HPV 16 + HPV 18 + OHR	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	1
INVALID	1	11.11%	5	55.56%	3	33.33%	0	0%	9

Tablica 5. Rezultati praćenja nakon nalaza ASCUS, ovisno o nalazu HPV testa

U grupi LSIL HR HPV pozitivan zabilježen je HSIL+ ishod u 13,08 % slučajeva što je statistički značajno više u usporedbi s grupom LSIL HR HPV negativan gdje nije zabilježen nijedan slučaj s ishodom HSIL+ ($\chi^2 = 10,121$; $P=0,0015$).

Negativan ishod zabilježen je u nižem postotku (8,41 %) u LSIL HR HPV pozitivnoj grupi u odnosu na LSIL HR HPV negativnu grupu (22,86 %) što je statistički značajna razlika ($\chi^2 = 10,414$; $P=0,0013$).

U grupi LSIL HR HPV pozitivan (N=214), u podgrupi LSIL s pozitivnim 16 i 18 genotipom (N=59) ishod HSIL+ zabilježen je u 14 (23,73 %) slučajeva, a u podgrupi s OHR (N=155), također u 14 (9,03 %) slučajeva, a razlika je statistički značajna ($\chi^2 = 8,053$; $P=0,0045$).

Rezultati su prikazani u tablici 6.

	NEMA PRAĆENJA		NEGATIVAN		ABNORMALAN ALI <HSIL		HSIL ILI VIŠE		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
LSIL HR HPV POZ	81	37.85%	18	8.41%	87	40.65%	28	13.08%	214
LSIL HR HPV NEG	32	45.71%	16	22.86%	22	31.43%	0	0%	70
LSIL HPV 16	4	18.18%	1	4.55%	10	45.45%	7	31.82%	22
LSIL HPV 18	2	16.67%	1	8.33%	8	66.67%	1	8.33%	12
LSIL OHR	67	43.23%	15	9.68%	59	38.06%	14	9.03%	155
LSIL HPV 16 + OHR	6	37.5%	1	6.25%	4	25%	5	31.25%	16
LSIL HPV 18 + OHR	1	12.5%	0	0.0%	6	75.0%	1	12.5%	8
LSIL HPV 16 + HPV 18	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
LSIL HPV 16 + HPV 18 + OHR	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	1
INVALID	1	50%	0	0%	1	50%	0	0%	2

Tablica 6. Rezultati praćenja nakon nalaza LSIL, ovisno o rezultatu HPV testa

U grupi ASC-H HR HPV pozitivan zabilježen je HSIL+ ishod u 24,24 % slučajeva u usporedbi s grupom ASC-H HR HPV negativan gdje je HSIL+ ishod zabilježen u 8,0 % slučajeva, ali oučena razlika nije statistički značajna ($\chi^2 = 3,151$; $P=0,0759$).

Negativan ishod zabilježen je u nižem postotku (12,12 %) u ASC-H HR HPV pozitivnoj grupi u odnosu na ASC-H HR HPV negativnu grupu (28 %) što je statistički značajna razlika ($\chi^2 = 3,848$; $P=0,0498$). U grupi ASC-H HR HPV pozitivan (N=99), u podgrupi ASC-H s pozitivnim 16 i 18 genotipom (N=37) ishod HSIL+ zabilježen je u 11 (29,73 %) slučajeva, a u podgrupi s OHR (N=62) u 13 (20,97 %) slučajeva, a razlika nije statistički značajna ($\chi^2 = 0,958$; $P=0,3276$).

Podatci su prikazani u tablici 7.

	NEMA PRAĆENJA		NEGATIVAN		ABNORMALAN ALI <HSIL		HSIL ILI VIŠE		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
ASC-H HPV POZ	26	26.26%	12	12.12%	37	37.37%	24	24.24%	99
ASC-H HPV NEG	10	40%	7	28%	6	24%	2	8.0%	25
ASC-H HPV 16 POZ	4	19.05%	4	19.05%	7	33.33%	6	28.57%	21
ASC-H HPV 18	0	0%	1	25%	2	50%	1	25%	4
ASC-H OHR	19	30.65%	5	8.06%	25	40.32%	13	20.97%	62
ASC-H HPV 16 + OHR	1	12.5%	2	25%	2	25%	3	37.5%	8
ASC-H HPV 18 + OHR	2	50%	0	0%	1	25%	1	25.00%	4
ASC-H HPV 16 + HPV 18	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
ASC-H HPV 16 + HPV 18 + OHR	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
INVALID	0	0%	0	0%	0	0%	1	100%	1

Tablica 7. Rezultati praćenja nakon nalaza ASC-H, ovisno rezultatu HPV testa

U grupi HSIL HR HPV pozitivan zabilježen je HSIL+ ishod u 64,36 % slučajeva u usporedbi s grupom HSIL HR HPV negativan gdje je od ukupno osam slučajeva kod njih 6 (75%) zabilježen HSIL+ ishod. Razlika nije statistički značajna ($X^2 = 0,448$; $P=0,5033$).

Negativan ishod zabilježen je ukupno u samo 17 slučajeva HSIL, u 9,04 % slučajeva u HSIL HR HPV pozitivnoj grupi, a u nijednom slučaju u HSIL HR HPV negativnoj grupi, a razlika nije statistički značajna ($X^2 = 0,788$; $P=0,3748$).

U grupi HSIL HR HPV pozitivan (N=189), u podgrupi HSIL s pozitivnim 16 i 18 genotipom (N=96) ishod HSIL+ zabilježen je u 68 (70,83 %) slučajeva, a u podgrupi s OHR (N=93) u 54 (58,06 %) slučajeva, a razlika je uočljiva, ali nije statistički značajna ($X^2 = 3,348$; $P=0,0673$).

Rezultati su prikazani u tablici 8.

	NEMA PRAĆENJA		NEGATIVAN		ABNORMALAN, ALI <HSIL		HSIL ILI VIŠE		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
HSIL HR HPV POZ	24	12.77%	17	9.04%	26	13.83%	122	64.36%	189
HSIL HR HPV NEG	0	0%	0	0%	2	25%	6	75%	8
HSIL HPV 16	10	19.23%	2	3.85%	4	7.69%	36	69.23%	52
HSIL HPV 18	1	9.09%	0	0%	2	18.18%	8	72.73%	11
HSIL OHR	8	8.70%	12	13.04%	18	19.57%	54	59.3%	92
HSIL HPV 16 + OHR	4	15.38%	2	7.69%	1	3.85%	19	73.08%	26
HSIL HPV 18 + OHR	1	16.67%	1	16.67%	1	16.67%	3	50%	6
HSIL HPV 16 + HPV 18	0	0%	0	0%	0	0%	2	100%	2
HSIL HPV 16 + HPV 18 + OHR	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
INVALID	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0

Tablica 8. Rezultati praćenja nakon nalaza HSIL, ovisno o nalazu HPV testa

Analizom ishoda u odnosu na HPV rezultat, bez obzira na nalaz papa testa, dobiveni su sljedeći rezultati. U grupi HPV negativan u 0,55 % slučajeva ishod je bio HSIL+, a u grupi HPV pozitivan u 21,78 % slučajeva što je statistički značajna razlika ($X^2 = 418,878$; $P < 0,0001$).

U grupi HPV negativan u 32,54 % slučajeva ishod je bio negativan, a u grupi HPV pozitivan u 14,85 % slučajeva što je statistički značajna razlika ($X^2 = 98,961$; $P < 0,0001$).

U grupi HR HPV pozitivan (N=909) ishod HSIL+ nađen je u 198 slučaja. U podgrupi s pozitivnim HPV 16 i 18 (N=290) nađen je u 103 (35,52 %) slučaja, a u grupi s pozitivnim OHR (N=619) u 95 (15,35 %) slučaja, a razlika je statistički značajna ($X^2 = 35,267$; $P < 0,0001$).

Rezultati su prikazani u tablici 9.

	NEMA PRAĆENJA		NEGATIVAN		ABNORMALAN, ALI <HSIL		>HSIL		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
HPV NEG	1232	62.16%	645	32.54%	94	4.74%	11	0.55%	1982
HPV POZ	294	32.34%	135	14.85%	282	31.02%	198	21.78%	909
HPV 16	37	27.21%	15	11.03%	33	24.26%	51	37.50%	136
HPV 18	12	24.49%	4	8.16%	21	42.86%	12	24.49%	49
OHR	218	35.22%	107	17.29%	199	32.15%	95	15.35%	619
HPV 16 + OHR	18	24%	8	10.67%	17	22.67%	32	42.67%	75
HPV 18 + OHR	5	21.74%	1	4.35%	11	47.83%	6	26.09%	23
HPV 16 + 18	1	25%	0	0%	1	25%	2	50%	4
16+18+OHR	3	100%	0	0%	0	0%	0	0%	3
INVALID	4	16%	16	64%	4	16%	1	4%	25

Tablica 9. Rezultati praćenja ovisno o rezultatima HPV testa

12,18% (N=24) žena s nalazom HSIL-a nema praćenje. U kombinaciji s pozitivnim nalazom na HPV 16, 14 žena nema praćenje, a u kombinaciji s nalazom HPV-a 18 2 žene, što odgovara postotcima od 17,5% i 10,52% u tim podskupinama.

Bez obzira na nalaz papa testa, čak 27,06% pacijentica (N=59) s nalazom HPV-a 16 nema praćenje, dok kod HPV-a 18 taj postotak iznosi 23,61% (N=17).

Rezultati su prikazani u tablici 10.

	N	UDIO
HSIL bez praćenja	24	12,18%
HSIL HPV 16 pozitivan bez praćenja	14	17,5%
HSIL HPV 18 pozitivan bez praćenja	2	10,52%
HPV 16 pozitivan bez praćenja bez obzira na papa test	59	27,06%
HPV 18 pozitivan bez praćenja bez obzira na papa test	17	23,61%

Tablica 10. Broj žena s nalazom HSIL+ i/ili HPV 16 ili HPV 18 pozitivitetom bez praćenja

4.4. Rezultati prema dobi

Ukupni pozitivitet na 16 i 18 u negativnom citološkom nalazu u grupi <30 godina je nađen kod 7 žena (2,73 %), a kod žena >30 godina kod 16 (1,22 %), i razlika nije statistički značajna ($\chi^2= 3.375$; $P= 0.0662$)

Podatci su prikazani u tablici 11.

	HPV NEG		HPV 16		HPV 18		OHR HPV		KOINF (16 ili 18 + OHR)		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
PAPA NEG <30 g.	211	82.42%	2	0.78%	0	0%	38	14.84%	5	1.95%	256
PAPA NEG >30 g.	1225	93.65%	7	0.54%	5	0.38%	67	5.12%	4	0.31%	1308
χ^2	35.893		0.214		0.975		32.289		10.006		
P	< 0.0001		0.6437		0.3234		< 0.0001		0.0016		

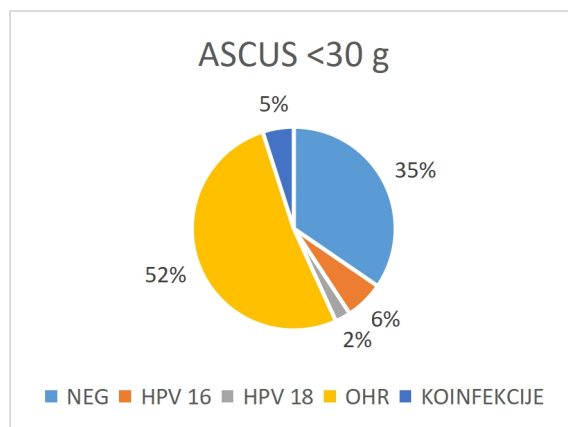
Tablica 11. Nalazi HPV testa kod negativnog papa testa u skupini žena mlađih i starijih od 30 godina

Ukupni pozitivitet na 16 i 18 u ASCUS citološkom nalazu u grupi <30 godina je nađen kod 11 žena (13,58 %), a kod žena >30 godina kod 58 (10,34 %), i razlika nije statistički značajna ($\chi^2= 0.773$; $P= 0.3792$).

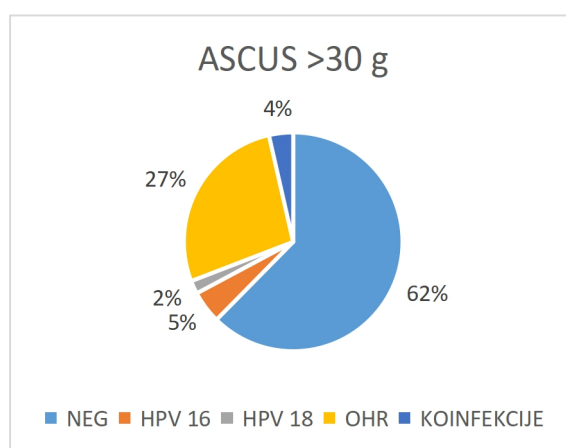
Rezultati su prikazani u tablici 12 i na slikama 5 i 6.

	HPV NEG		HPV 16		HPV 18		OHR HPV		KOINF (16 ili 18 + OHR)		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
ASCUS <30 g.	28	34.57%	5	6.17%	2	2.47%	42	51.85%	4	4.94%	81
ASCUS >30 g.	350	62.39%	27	4.81%	11	1.96%	153	27.27%	20	3.57%	561
χ^2	22.591		0.276		0.093		20.191		0.368		
P	< 0.0001		0.5992		0.7608		< 0.0001		0.5440		

Tablica 12. Nalazi HPV testa kod nalaza ASCUS u skupini žena mlađih i starijih od 30 godina



Slika 5. Nalazi HPV testa kod žena mlađih od 30 godina s nalazom ASCUS



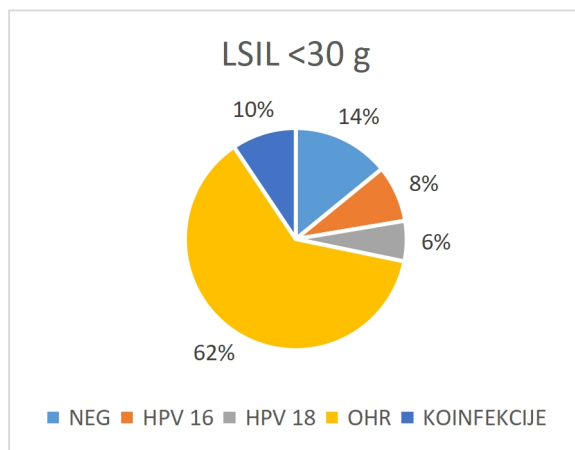
Slika 6. Nalazi HPV testa kod žena starijih od 30 godina s nalazom ASCUS

Ukupni pozitivitet na 16 i 18 u LSIL citološkom nalazu u grupi <30 godina je nađen kod 20 žena (23,53 %), a kod žena >30 godina kod 39 (19,79 %), i razlika nije statistički značajna ($X^2= 1,154$; $P= 0,2827$).

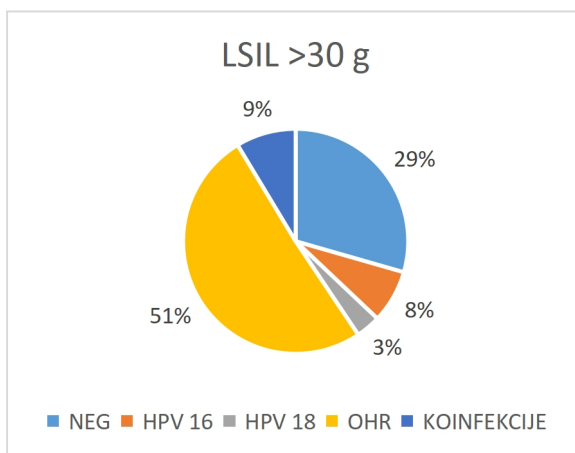
Rezultati su prikazani u tablici 13 i na slikama 7 i 8.

	HPV NEG		HPV 16		HPV 18		OHR HPV		KOINF (16 ili 18 + OHR)		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
LSIL <30 g.	12	14.12%	7	8.24%	5	5.88%	53	62.35%	8	9.41%	85
LSIL >30 g.	58	29.44%	15	7.61%	7	3.55%	100	50.76%	17	8.63%	197
X ²	7.442		0.033		0.789		3.202		0.045		
P	0.0064		0.8566		0.3744		0.0735		0.8328		

Tablica 13. Nalazi HPV testa kod nalaza LSIL u skupini žena mlađih i starijih od 30 godina



Slika 7. Nalazi HPV testa kod žena mlađih od 30 godina s nalazom LSIL



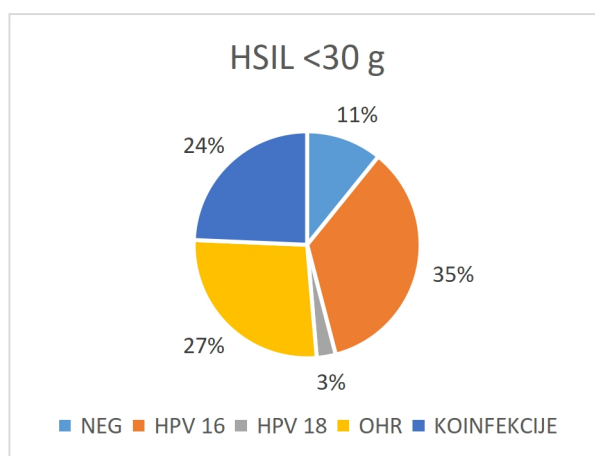
Slika 8. Nalazi HPV testa kod žena starijih od 30 godina s nalazom LSIL

Ukupni pozitivitet na 16 i 18 u HSIL citološkom nalazu u grupi <30 godina je nađen kod 23 žene (62,26 %), a kod žena >30 godina kod 74 (46,25 %), ali razlika nije statistički značajna ($X^2= 3.066$; $P= 0.0799$).

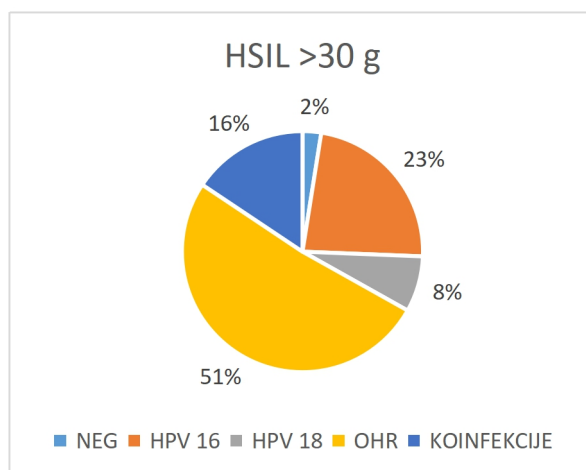
Rezultati su prikazani u tablici 14 i na slikama 9 i 10.

	HPV NEG		HPV 16		HPV 18		OHR HPV		KOIN (16 ili 18 + OHR)		Σ
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
HSIL <30 g.	4	10.81%	13	35.14%	1	2.70%	10	27%	9	24.32%	37
HSIL >30 g.	4	2.50%	37	23.13%	12	7.50%	82	51%	25	15.63%	160
X ²		5.300		2.277		1.118		6.923		1.325	
P		0.0213		0.1313		0.2904		0.0085		0.2497	

Tablica 14. Nalazi HPV testa kod nalaza HSIL u skupini žena mlađih i starijih od 30 godina



Slika 9. Nalazi HPV testa kod žena mlađih od 30 godina s nalazom HSIL



Slika 10. Nalazi HPV testa kod žena starijih od 30 godina s nalazom HSIL

4.5. Vrijednost papa i HPV testa

Osjetljivost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrijednost (PPV), negativna prediktivna vrijednost (NPV) i dijagnostička točnost (DT) u detekciji HSIL i težih lezije, za papa test,

HPV test i kotest izračunati su na osnovi ishoda koji su definirani kao negativan i HSIL+.

Ishod koji ima abnormalan nalaz, ali manje od HSIL nije uračunat jer u tim slučajevima trajanje praćenja treba biti dulje da bi se zabilježio točan ishod.

Pri izračunu za papa test postavljena su dva kriterija. Prvi je ASCUS+ kada se kao pozitivan nalaz papa testa smatra svaki abnormalan nalaz. Drugi je ASC-H+ kad se pozitivnim nalazom papa testa smatraju nalazi ASC-H, HSIL, AGC, AIS i karcinom.

	NEGATIVAN		ABNORMALAN, ALI <HSIL		HSIL ILI VIŠE		Ukupno
	N	UDIO	N	UDIO	N	UDIO	
NEG PAPA, hrHPV POZ	40	53.33%	32	42.67%	3	4%	75
NEG PAPA, hrHPV NEG	457	94.62%	26	5.38%	0	0	483
ASCUS HR HPV POZ	45	27.78%	97	59.88%	20	12.34%	162
ASCUS HR HPV NEG	154	80,63%	36	18.85%	1	0.52%	191
LSIL HR HPV POZ	18	13.54%	87	64.41%	28	21.05%	133
LSIL HR HPV NEG	16	42.10%	22	57.89%	0	0%	38
ASC-H HPV POZ	12	16.44%	37	50.68%	24	32.88%	73
ASC-H HPV NEG	7	46.67%	6	40%	2	13.33%	15
HSIL + hrHPV POZ	17	10.30%	26	15,75%	122	73,94%	165
HSIL + hrHPV NEG	0	0	2	25%	6	75%	8
AGC/AIS/ACA HR HPV POZ	0	0	2	66,67%	1	33,33%	3
AGC/AIS/ACA HR HPV NEG	8	72,72%	1	9,09%	2	18,19%	11

Tablica 15. Ishodi praćenja ovisno o grupi papa nalaza i HPV testiranja

	NEGATIVAN ISHOD		HSIL ILI VIŠE	
	N	%	N	%
HPV POZ	135	40,54	198	59,46
HPV 16 i 18	28	22,4	97	77,6
HPV NEG	645	98,32	11	1,68
ABNORMALNI PAPA NALAZ ASCUS+	277	57,35	206	42,65
ABNORMALNI PAPA NALAZ LSIL+	78	29,66	185	70,34
ABNORMALNI PAPA NALAZ ASC-H+	44	21,89	157	78,11
PAPA NEG	497	99,4	3	0,6
Kotest pozitivan	317	60,27	209	39,73
Kotest negativan	457	94,62	0	0

Tablica 16. negativni i HSIL+ ishodi

	Osjetljivost	Specifičnost	PPV	NPV	DT
HPV test	94,74	82,69	59,46	98,32	85,24
HPV 16 i 18	46,41	96,41	77,60	87,04	85,84
Papa test, ASCUS+	98,56	64,21	42,65	99,40	71,52
Papa test, LSIL+	88,52	89,92	70,34	96,67	89,62
Papa test ASC-H+	75,12	94,19	77,72	93,35	90,14
Kotest	100,00	59,04	39,73	100,00	67,75

Tablica 17. Osjetljivost, specifičnost, PPV, NPV i DT

5. Rasprava

Prosječna starost pacijentica bila je 42 godine, a najveći broj žena pripadao je skupini 35-39 godina starosti. Dobna raspodjela pacijentica odgovarala je očekivanj, s obzirom da je 91,5% pacijentica bilo podvrgnuto HPV testiranju zbog prethodnih abnormalnih papa nalaza ili terapijskih zahvata na vratu maternice, a samo 8,5% u svrhu probira. Samo 6% pacijentica bilo je mlađe od 25 godina, a rad je pokazao bitnim obuhvatiti i tu dobnu skupinu, s obzirom da je ondje pronađeno 15 HSIL nalaza.

Među pozitivnim nalazima HPV testiranja, najzastupljeniji su bili ostali visokorizični tipovi s udjelom od 21,23%, a potom slijede HPV 16 sa 4,66% te HPV 18 s 1,68%. Ovi podatci jasno ukazuju na važnost ostalih visokorizičnih tipova u abnormalnim nalazima papa testa te nalazima HPV testiranja. U skupini žena koje su bile pozitivne na HPV 16 i HPV 18, čak 34,82% imalo je koinfekciju s ostalim visokorizičnim tipovima, što potvrđuje visoku učestalost koinfekcija, poput velikog istraživanja u Kini s 6086 HPV16/18 pozitivnih žena, gdje je ta učestalost bila 33,24%.³⁸ S druge strane, istovremena infekcija tipovima 16 i 18 nađena je kod samo 7 žena, što bi moglo ići u prilog kompleksnijoj interakciji između tih tipova.³⁹

U skupini negativnih papa testova, pozitivitet na HPV 16 i HPV 18 bio je iznimno rijedak. Kod lezija niskog stupnja prevladavali su negativni rezultati HPV testa i pozitivitet na ostale visokorizične tipove, s time da je kod ASCUS-a najčešći rezultat bio negativan, a kod LSIL-a ostali visokorizični tipovi. Prema literaturi, 70-80% slučajeva LSIL povezano je s HPV-om visokog rizika, što je ovo istraživanje potvrdilo sa 75%.⁴⁰ Također, ASCUS je očekivano bio najčešći abnormalni citološki nalaz u istraživanju. U skupini ASC-H i HSIL negativan HPV test bio je prisutan u samo 10,3% slučajeva, a HPV 16 i 18 pozitivitet bio je statistički značajno češći u lezijama visokog stupnja. Istraživanje je pokazalo dobru korelaciju između nalaza HPV testiranja i papa testa.

U skupini glandularnih lezija u čak 67% slučajeva nalaz HPV testiranja bio je negativan. Ovaj podatak pokazuje posebnu kompleksnost u dijagnosticiranju ovih lezija. Iako se HPV 18 najčvršće povezuje kao uzrokom glandularnih lezija, on je bio prisutan u samo 17% slučajeva.

U skupini negativnog papa nalaza uz hrHPV pozitivitet bilo je značajno više abnormalnih ishoda koji su bili nižeg stupnja od HSIL-a (25%) nego što je to bilo u HPV negativnoj skupini (1,77%). S obzirom na kratko vrijeme praćenja u ovom istraživanju, te pacijentice nužno je nastaviti pratiti, jer po nekim istraživanjima, jedna od pet žena s negativnim nalazom papa testa, ali pozitivitetom na HPV visokog rizika razvit će HSIL ili više u narednih nekoliko godina.⁴¹

U grupi nalaza ASCUS postojala je statistički značajna razlika pojave HSIL+ ishoda tijekom praćenja između skupine ASCUS hrHPV pozitivnih (7,55%) i ASCUS hrHPV negativnih žena (0,26%). Također, zabilježena je i statistički značajna razlika u negativizaciji između ASCUS hrHPV negativne grupe (40,63%) i ASCUS hrHPV pozitivne grupe (16,98%). Ove velike razlike su moguće jer je ASCUS najčešći citološki nalaz, a vrlo često nije povezan s infekcijom HPV-a.

U grupi nalaza LSIL, također su zabilježene statistički značajne razlike između hrHPV pozitivnih i hrHPV negativnih žena u progresiji do HSIL+ ishoda te negativizaciji. Kod pacijentica s nalazom LSIL i hrHPV negativitetom, nije zabilježen niti jedan slučaj s ishodom HSIL ili više. Za razliku od žena s nalazom ASCUS, ovdje je postojala značajna razlika između ishoda ovisno o genotipu HPV virusa, a lošiji ishod je bio očekivano povezan s tipovima 16 i 18. Ovi podaci idu u prilog tome da tipovi 16 i 18 češće i brže progrediraju u lezije visokog stupnja, nego što to čine ostali tipovi.

Razlike u ishodima u grupi nalaza ASCUS-a i LSIL-a ovisno o HPV statusu pokazala su važnost trijaže HPV testiranjem, a kod LSIL-a važnom se pokazala i parcijalna genotipizacija u stratifikaciji rizika za progresiju lezija.

U grupi ASC-H hrHPV pozitivnih žena, gotovo trećina pacijentica koje su imale podatak o praćenju imala je ishod HSIL, što nam pokazuje koliko je ova grupa važna za naknadno otkrivanje HSIL-a, s obzirom da se po nekim statistikama HSIL najčešće otkrije tijekom praćenja žena s nalazom ASC-H, i to u 45% slučajeva tijekom 5 godina praćenja²². Isti ishod je bio manje čest u HPV negativnih žena, ali statistički razlika nije bila značajna, no postojala je značajna razlika u negativizaciji. Nije postojala statistički značajna razlika s obzirom na pozitivitet na 16 i 18 te OHR HPV.

U grupi HSIL nije bilo statistički značajne razlike u ishodu HSIL između HPV pozitivnih i negativnih žena. Nije postojala ni značajna razlika u negativizaciji, i čak suprotno očekivanom, u hrHPV negativnoj grupi nije bilo negativnog ishoda niti u jednom slučaju. Niti u ovoj skupini nalaza nije postojala statistički značajna razlika između genotipova 16 i 18 te OHR, što pokazuje da su ostali visokorizični tipovi povezani s oko polovicom nalaza visokog stupnja.

Gledajući sve skupine rezultata papa testova zbirno, postojala je statistički značajna razlika u HSIL+ ishodu između HPV 16 i 18 pozitivnih, te OHR pozitivnih, što ipak potvrđuje njihovu različitu biologiju.

Zabrinjavajući su podatci koji pokazuju da 12% pacijentica s lezijama visokog stupnja te četvrtina s HPV 16 i 18 pozitivitetom nema praćenje. Takve pacijentice, prema smjernicama za dijagnostiku i liječenje lezija vrata maternice, trebaju bez odgode pristupiti kolposkopiji i daljnoj patohistološkoj dijagnostici te ovaj podatak treba biti poticaj za kvalitetniji pristup u skrbi pacijentica s najvišim rizikom za razvoj karcinoma²⁷. Nedostatak ovog istraživanja je kratko vrijeme praćenja, što je moglo imati utjecaja na povećan broj žena

za koje nije zabilježen ishod bolesti, ali i na podatke vezane uz negativizaciju ili progresiju bolesti, s obzirom da se apsolutni rizik najčešće opisuje rizikom u idućih 5 ili 10 godina, zbog često sporog napredovanja lezija. Prednost istraživanja je velik broj ispitanica što u ispitivanim kategorijama i grupama s jasno definiranim kriterijima dozvoljava donošenje kvalitetnih zaključaka.

Neočekivano, ali nije bilo statistički značajne razlike u udjelima pozitiviteta na HPV 16 i 18 niti u jednoj citološkoj grupi nalaza između žena mlađih i starijih od 30 godina. Prema prethodnim istraživanjima, HPV 16 ima veću prevalenciju u mlađim dobnim skupinama.³⁹ Ostali visokorizični tipovi činili su veći udio u nalazima lezija niskog stupnja u žena mlađih od 30 godina te češći u nalazima visokog stupnja u žena starijih od 30 godina. Ovi podatci podržavaju teoriju da ostali visokorizični tipovi progrediraju sporije od HPV tipova 16 i 18, što onda u mlađim dobnim skupinama uzrokuje regredirajuće lezije niskog stupnja, a u slučaju perzistentne infekcije u starijim dobnim skupinama dolazi i do lezija visokog stupnja.¹¹

Osjetljivost papa testa na razini svih abnormalnih nalaza ASCUS+ (98,56%) i HPV testa (94,74%) u ovoj studiji je visoka, kao i negativna prediktivna vrijednost. Zbog uočenih relativno niskih vrijednosti specifičnosti kod oba testa, analizom dodatne stratifikacije nalaza postiže se povišenje specifičnosti. Kod papa testa pomoću stupnja težine lezije najbolje vrijednosti specifičnosti pojavljuju se kod nalaza ASC-H+ (94,19%), a kod HPV testa kod pozitiviteta na HPV 16 i 18 (96,41%). Najvišu vrijednost dijagnostičke točnosti pokazuje rezultat papa testa ASC-H+. Kotestiranje je pokazalo osjetljivost od 100%, no specifičnost od samo 59% što se može korigirati spomenutom stratifikacijom nalaza papa i HPV testa. Osjetljivost je najvažnija vrijednost kojom se mjeri učinkovitost nekog testa u probiru. Rezultat od 100% osjetljivosti kotestiranja od iznimnog je značenja jer primjenom papa testa i HPV testa istovremeno ili u kraćem razmaku u ovoj studiji nije propuštena nijedna dijagnoza

HSIL+ lezije. U ovoj studiji lažno negativnih papa testova kod HSIL+ ishoda bilo je tri, a kod HPV testa 11, od čega su dva bili nalazi adenokarcinoma cerviksa. U studiji Blatt i sur. papa test imao je osjetljivost od 91,3%, HPV test 94%, a kotestiranje 98,8%, dok je čak 18,6% karcinoma bilo negativno na hrHPV, 12,2% na papa test, a samo 5,5% na kotest.⁴² U studiji Kaufman HW i sur. na uzorku od preko 13 milijuna kotestova pokazana je viša vrijednost HrHPV testa u otkrivanju CIN3/AIS lezija, a citologije u detekciji karcinoma⁴³. Stoga, rezultati ove studije u skladu su sa studijama na velikom broju uzoraka koje su pokazale nedostatke primjene HPV testa kao jedinog primarnog testa u probiru te preporučuju primjenu kotestiranja.

6. Zaključak

Istraživanje je pokazalo važnost trijažnog HPV testiranja kod ASCUS i LSIL nalaza zbog statistički značajnih razlika u vidu negativnog ishoda te ishoda HSIL-a ili više kod HPV pozitivnih i HPV negativnih žena. Iako je istraživanje dokazalo i važnost parcijalne genotipizacije s obzirom na značajno učestalije ishode HSIL ili više u žena koje su bile pozitivne na tipove 16 i 18, i ostali visokorizični tipovi HPV-a su se pokazali izrazito bitnim uzrokom lezija visokog stupnja. Također, poseban oprez kod HPV negativnih žena treba obratiti kod glandularnih lezija, s obzirom na visoki udio HPV negativiteta u toj skupini.

Kotestiranje je pokazalo osjetljivost od 100% te specifičnost od 59%. S obzirom da je kotestiranje pokazalo najveću osjetljivost u istraživanju, a ona je najvažnija vrijednost u mjerenju učinkovitosti testova u probiru te na mogućnost korekcije niske specifičnosti stratifikacijom nalaza papa i HPV testa, ovaj rad pokazao je nedostatke u korištenju HPV testiranja kao jedinog primarnog testa u probiru te ukazao na prednost kotestiranja.

7. Sažetak

Cilj: Cilj rada bio je istražiti povezanost nalaza humanog papiloma virusa testiranjem na HPV 16 genotip, HPV 18 genotip te na grupu ostalih visokorizičnih HPV genotipova s citološkim nalazom papa testa žena koje sudjeluju u probiru, obradi i praćenju lezija vrata maternice, te usporediti podatke o praćenju i ishodu bolesti. **Materijali i postupci:** Retrospektivno su analizirani rezultati 2916 pacijentica čiji su testovi na HPV visokog rizika i papa testovi obrađeni u Kliničkom bolničkom centru Rijeka u periodu od 6. svibnja 2019. godine do 2. veljače 2021. godine. Pacijentice su bile praćene u trajanju od 1 do 18 mjeseci. **Rezultati:** Najveći broj pacijentica bio je pozitivan na OHR HPV (21,23%), a potom na HPV 16 (4,66%) i HPV 18 (1,68%), a 3,6% pacijentica bilo je pozitivno na više tipova HPV-a. Učestalost HSIL+ ishoda bila je statistički značajno veća u grupi HPV pozitivnih žena nego u grupi HPV negativnih (21,78% vs. 0,55%; $P < 0,0001$). Također, u podskupini HPV 16 i 18 pozitivnih žena bilo je statistički značajno više HSIL+ ishoda nego kod OHR HPV pozitivnih žena (35,52% vs. 15,35%, $P < 0,0001$). Nije pronađena statistički značajna razlika u prevalenciji genotipova 16 i 18 između žena mlađih i starijih od 30 godina niti u jednoj skupini nalaza papa testa. Kotestiranje je pokazalo osjetljivost od 100%, ali specifičnost od 59%. **Zaključak:** Istraživanje je dokazalo važnost trijažnog HPV testiranja kod ASCUS i LSIL nalaza te važnost parcijalne genotipizacije u predviđanju HSIL ishoda, ali i važnost ostalih visokorizičnih tipova HPV-a u nastanku lezija visokog stupnja. Kotestiranje bi trebalo imati prednost nad korištenjem HPV testiranja kao jedinog primarnog testa u probiru, s obzirom na veću osjetljivost.

Ključne riječi: HPV visokog rizika, papa test, HPV testiranje, parcijalna genotipizacija

8. Summary

Aim: The aim of this study was to evaluate the association of human papillomavirus by HPV 16 genotype, HPV 18 genotype and other high-risk HPV genotypes with cytological findings of Pap smear in women participated in screening, management and follow-up of cervical cytological abnormalities, and compare results of follow-up and outcomes of disease.

Materials and methods: The results of 2916 patients whose high-risk HPV tests and pap tests were processed at the Clinical Hospital Center Rijeka from May 6, 2019 to February 2, 2021 were retrospectively analyzed. Follow-up period was between 1 and 18 months. **Results:**

The most of the patients was positive for OHR HPV (21.23%), followed by HPV 16 (4.66%) and HPV 18 (1.68%), and 3.6% of patients were positive for more than one type of HPV. The prevalence of HSIL + outcomes was statistically significantly higher in HPV-positive women than in HPV-negative women (21.78% vs. 0.55%; $P < 0.0001$). Also, there were statistically significantly more HSIL + outcomes in HPV 16 and 18 positive women than in the OHR HPV positive women (35.52% vs. 15.35%, $P < 0.0001$). No statistically significant difference was found in the prevalence of genotypes 16 and 18 between women younger and older than 30 in any group of pap test findings. Cotesting showed a sensitivity of 100% but a specificity of 59%. **Conclusion:** The study proved the importance of triage HPV testing in ASCUS and LSIL findings and the importance of partial genotyping in predicting HSIL outcome, but also the importance of other high-risk HPV types in the development of high-grade lesions. Co-testing should be preferred over the HPV primary screening strategy, due to the greater sensitivity.

Key words: high-risk human papillomavirus, pap test, HPV testing, partial genotyping

9. Literatura

1. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature Publishing Group. 2002 May 1;2(5):342–50
2. Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, Burchell AN, de Sanjose S, Kruger Kjaer S, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine*. 2008 Aug 19; 26 Suppl 10(0 10) :K17–28.
3. Monk BJ, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. *Gynecologic Oncology*. 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S6-13.
4. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2006 Jan 30;2006:1–5.
5. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011 May 2;103(5):368–83.
6. Behtash N, Mehrdad N. Cervical cancer: screening and prevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2006;7(4):683–6.
7. Prendiville W, Sankaranarayanan R. *Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer*. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2017.
8. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015;25:2-23.
9. Schiffman M, Castle PE. Human Papillomavirus: Epidemiology and Public Health. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Aug;127(8):930–4.
10. Teoh D, Musa F, Salani R, Huh W, Jimenez E. Diagnosis and Management of Adenocarcinoma in Situ: A Society of Gynecologic Oncology Evidence-Based Review and Recommendations. *Obstet Gynecol*. 2020 Apr;135(4):869–78.

11. Robadi IA, Pharaon M, Ducatman BS. The Importance of High-Risk Human Papillomavirus Types Other Than 16 and 18 in Cervical Neoplasia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2018 Jun;142(6):693–5.
12. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb 1;8(2):E191–203.
13. Grce M. III. europski tjedan prevencije raka vrata maternice. *Medix* [Internet]. 2009 [pristupljeno 04.04.2021.];15(80/81):42-44. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/68665>
14. Antoljak N, Jelavić M, Šupe Parun A. Nacionalni program ranog otkrivanja raka u Hrvatskoj. *Medix* [Internet]. 2013 [pristupljeno 06.04.2021.];19(104/105):86-88. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/106637>
15. Prijevod europskih smjernica za osiguranje kvalitete probira raka vrata maternice. 2nd ed. Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015.
16. Kong Y, Zong L, Yang J, Wu M, Xiang Y. Cervical cancer in women aged 25 years or younger: a retrospective study. *Cancer Management and Research*. 2019 Mar 6;11:2051–8.
17. Frelaut M, De Glas N, Zapardiel I, Kaidar-Person O, Kfoury M, You B, et al. Are Older Patients with Cervical Cancer Managed Differently to Younger Patients? An International Survey. *Cancers*. 2019 Dec 6;11(12).
18. Nacionalni program ranog otkrivanja raka vrata maternice. 2010.
19. Anttila A, Arbyn M, Bergeron C, Cuzick J, De Vuyst H, Dillner J, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. 2nd ed. Publications Office of the European Union; 2015.
20. Štemberger-Papić S, Vrdoljak-Mozetič D, Verša Ostojić D, Rubeša-Mihaljević R, Dinter M. Citologija vrata maternice (Papa-test) – terminologija i značaj u probiru za rak vrata

maternice. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2016 [pristupljeno 05.05.2021.];52(3):324-336.
https://doi.org/10.21860/medflum2016_324

21. Serdy K, Yildiz-Aktas I, Li Z, Zhao C. The Value of Papanicolaou Tests in the Diagnosis of Endometrial Carcinoma: A Large Study Cohort From an Academic Medical Center. *American Journal of Clinical Pathology*. 2016 Mar;145(3):350–4.

22. Nayar R, Wilbur DC, editors. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology*. 3rd ed. Springer; 2015; 103-193

23. Mahovlić V, Danijela Vrdoljak-Mozetič D, Štemberger-Papić S, Barišić A, Verša-Ostojić D. Klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice „Zagreb 2016“ – modifikacija klasifikacija „Zagreb 2002“ i „NCI Bethesda system 2014“. *Gynaecol Perinatol*. 2016;25(4):147–58. Klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice „Zagreb 2016“ – modifikacija klasifikacija „Zagreb 2002“ i „NCI Bethesda system 2014“. *Gynaecol Perinatol*. 2016;25(4):147–58.

24. Audy-Jurković S, Singer Z, Pajtlar M, Dražančić A, Grizelj V. Jedinствена klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice u Hrvatskoj. *Gynecol Perinatol* 1992; 1: 185-8

25. Ovanin-Rakić A, Pajtlar M, Stanković T i sur. Klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice „Zagreb 2002“: modifikacija klasifikacija „Zagreb 1990“ i „NCI Bethesda system 2001“. *Gynaecol Perinatol* 2003;12:148-53.

26. Vrdoljak-Mozetič D, Mahović V. Citologija vrata maternice: smjernice za osiguranje kvalitete u citološkim laboratorijima. *Hrvatsko društvo za kliničku citologiju hrvatskog liječničkog zbora*; 2020; 59-76

27. Cervikalne intraepitelne lezije. Smjernice za dijagnostiku i liječenje S3 postupnik. *HDGO* 2012;7-72

28. Ciavattini A, Serri M, Di Giuseppe J, Liverani CA, Gardella B, Papiccio M, et al. Long-term observational approach in women with histological diagnosis of cervical low-grade

- squamous intraepithelial lesion: an Italian multicentric retrospective cohort study. *BMJ Open*. 2019 Jun 3;9(7):1–6.
29. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):1–17.
30. Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, Martin-Hirsch PP, Mustafa RA, et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Aug 10;8(8).
31. Chao YS, Clark M, Ford C. HPV Self-Sampling for Primary Cervical Cancer Screening: A Review of Diagnostic Test Accuracy and Clinical Evidence. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health [Internet]. 2018; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532211/>
32. Grce M. Molekularna dijagnostika oralnih infekcija. *Acta medica Croatica* [Internet]. 2013 [pristupljeno 05.05.2021.];67(5):425-432. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/117910>
33. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, Chelmow D, Einstein MH, Garcia F, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis*. 2020;24:102–31
34. Botros G, Haddad N, Brooks J, Scalnan J. Study Of Cervical Screening For Women Under Age Of 25 Years Old, A Retrospective Data Analysis. *The Internet Journal of Gynecology and Obstetrics* [Internet]. 2009;14. Available from: <https://print.ispub.com/api/0/ispub-article/4762>
35. Wang S, He X, Meng F, Pan Q, Zhang L, Zeng J. Application of the Cobas 4800 System for the Detection of High-Risk Human Papillomavirus in 5650 Asymptomatic Women. *BioMed Research International*. 2020;2020:1–2.

36. Martin IW, Steinmetz HB, Lefferts CL, Dumont LJ, Tafe LJ, Tsongalis GJ. Evaluation of the Cobas 4800 HPV Test for Detecting High-Risk Human Papilloma-Virus in Cervical Cytology Specimens. *Pathogens* [Internet]. 2012 Sep 12;1(1):30–6.
37. Botros G, Haddad N, Brooks J, Scalnan J. Study Of Cervical Screening For Women Under Age Of 25 Years Old, A Retrospective Data Analysis. *The Internet Journal of Gynecology and Obstetrics* [Internet]. 2009;14. Available from: <https://print.ispub.com/api/0/ispub-article/4762>
38. Wu P, Xiong H, Yang M, Li L, Wu P, Lazare C, et al. Co-infections of HPV16/18 with other high-risk HPV types and the risk of cervical carcinogenesis: A large population-based study. *Gynecologic Oncology* [Internet]. 2019 Dec 1;155(3):436–43.
39. Vrdoljak-Mozetič D, Krašević M, Verša Ostojić D, Štemberger-Papić S, Rubeša-Mihaljević S, Bubonja-Šonje M. HPV16 genotype, p16/Ki-67 dual staining and koilocytic morphology as potential predictors of the clinical outcome for cervical low-grade squamous intraepithelial lesions. *Cytopathology*. 2013;26(1).
40. Biryukov J, Meyers C. Superinfection Exclusion between Two High-Risk Human Papillomavirus Types during a Coinfection. *Journal of Virology* [Internet]. 2018 Mar 28;92(8).
41. Wang Z, Liu T, Wang Y, Gu Y, Wang H, Liu J, et al. Risk of cervical lesions in high-risk HPV positive women with normal cytology: a retrospective single-center study in China. *Infectious Agents and Cancer*. 2020 May 21;15(1).
42. Blatt AJ, Kennedy R, Luff RD, Austin RM, Rabin DS. Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices. *Cancer Cytopathol*, 2015;123:282-8
43. Kaufman HW, Alagia DP, Chen Z, Onisko A, Austin RM, MD. Contributions of Liquid-Based (Papanicolaou) Cytology and Human Papillomavirus Testing in Cotesting for

Detection of Cervical Cancer and Precancer in the United States. *Am J Clin Pathol* 2020;154:
510–6.

Životopis

Nives Kolesarić rođena je 03.08.1996. godine u Osijeku. Tijekom ranog djetinjstva seli se u Rijeku, gdje je pohađala Osnovnu školu „Zamet” u periodu od 2003. do 2011. godine. 2011. godine upisala je Gimnaziju Andrije Mohorovičića Rijeka, prirodoslovno-matematički smjer. Maturirala je 2015. godine i potom iste godine upisala Integrirani preddiplomski i diplomski studij Medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Od 2019. godine radi kao demonstrator na Zavodu za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju. U prosincu 2020. godine volontirala je u Corona respiracijskom centru (CRC) KBC-a Rijeka.