

Sodobni molekularni pristopi v presejanju za raka materničnega vratu

Mario Poljak

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, Ljubljana

Povzetek

Svetovna zdravstvena organizacija je napovedala eliminacijo raka materničnega vratu (RMV) do konca 21. stoletja. Eden od treh pogojev za eliminacijo RMV je, da bo vsaj 70 % vseh žensk na svetu v starosti 35–45 let dvakrat pregledanih z zelo natančnim presejalnim testom. Enotno stališče strokovnjakov je, da je temu pogoju mogoče zadostiti v veliki večini držav le z uporabo molekularnih testov HPV. Široka uporaba klinično nezadostno preverjenih testov HPV še vedno predstavlja veliki problem, ki se je dodatno poglobil med pandemijo COVID-19. V prispevku bodo predstavljene novosti na področju testov HPV, tako tistih za dokazovanje DNK HPV kot RNK HPV ter nekateri drugi sodobni molekularni pristopi v presejanju za RMV.

Ključne besede: rak materničnega vratu, človeški papilomavirusi, HPV, presejanje, triaža, metilacija

Uvod

Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je razglasila nov cilj na področju obvladovanja raka materničnega vratu (RMV) – eliminacijo tega pomembnega raka kot javnozdravstvenega problema. SZO poziva k celovitemu, na prebivalstvu temelječemu pristopu, ki želi eliminacijo RMV doseči še v tem stoletju in v prav vseh državah na svetu. S trenutnimi preventivnimi ukrepi pojavnosti RMV ni mogoče zmanjšati na nič do konca 21. stoletja (eradikacija RMV). Strokovnjaki SZO so ugotovili, da RMV ne bi smeli več šteti za javnozdravstveni problem, če se starostno prilagojena pojavnost RMV zmanjša na manj kot 4/100,000 žensk/leto (eliminacija RMV). SZO želi doseči eliminacijo RMV čimprej in v čim več državah. Zato v obdobju 2020–2030 predlaga kombinirani pristop, ki bo vsaj nekaterim državam omogočil doseči globalne cilje do leta 2030. Predlagani cilji za leto 2030 so:

- 90 % deklet je pred dopolnjenim 15. letom starosti v celoti cepljenih s cepivom proti človeškemu papilomavirusom (HPV);
- 70 % žensk je pregledanih z zelo natančnim presejalnim testom v starosti 35–45 let;
- 90 % žensk z dokazanim RMV oziroma predrakavimi spremembami je deležnih ustreznega zdravljenja in nege.

Enotno stališče strokovnjakov je, da je vsaj 70 % pregledanost žensk z zelo natančnim presejalnim testom v starosti 35–45 let na svetovni ravni do leta 2030 mogoče doseči v veliki večini držav le z uporabo

molekularnih testov za dokazovanje HPV, povzročiteljev skoraj vseh primerov RMV. Testi HPV, ki jih uporabljamo v ta namen, večinoma dokazujejo DNK HPV omejenega števila klinično najpomembnejših genotipov HPV, in sicer največkrat 13 ali 14 genotipov (1).

Testi za dokazovanje DNK HPV v presejanju za RMV

Smernice, ki narekujejo uporabo testov, ki dokazujejo DNK HPV, temeljijo izključno na uporabi klinično preverjenih testov (2, 3).

Testiranje na DNK HPV za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za RMV se bistveno razlikuje od molekularnega testiranja na druge medicinsko pomembne viruse, ker visoka analitična občutljivost testa ni glavno merilo za njegovo dobro klinično uporabnost. Kljub temu dejstvu ima več kot tri četrtine komercialno dostopnih testov za dokazovanje DNK HPV, ki se trenutno uporabljajo po svetu, previsoko analitično občutljivost. Ta vodi v prekomerno odkrivanje prehodnih klinično nemih in produktivnih okužb s HPV. S tem se večja število nepotrebnih kolposkopij in biopsij, korelacija testa HPV s histologijo je slaba, več je nepotrebnega zdravljenja, med zdravniki pa se širi nezaupanje v pozitivne rezultate testa HPV.

Druga posebnost testov za dokazovanje DNK HPV, v primerjavi z drugimi mikrobiološkimi testi, je ta, da je za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za RMV, potrebno uravnovesiti število tarčnih genotipov HPV v testu. Tako je pri načrtovanju testa HPV

potrebno zelo dobro pretehtati, kako uskladiti klinično občutljivost s klinično specifičnostjo za odkrivanje predrakavih sprememb. Z vključitvijo genotipov HPV, ki so pogosti pri nemih okužbah ali predrakavih spremembah nizke stopnje in le redko ali izjemoma povezani z RMV (npr. HPV53 ali HPV66), tvegamo zelo velik padec klinične specifičnosti testa HPV ob zanemarljivi izboljšavi klinične občutljivosti. Prav tako je potrebno imeti v mislih, da ne glede na največjo možno analitično občutljivost testa HPV, s katerim npr. izvedemo primarno presejanje za RMV, negativni izvid ni nikoli popolno zagotovilo za odsotnost bolezni. To je posledica mnogih drugih od testa HPV neodvisnih dejavnikov, kot so npr. nekakovostno odvzet bris, za bris nedostopna sprememba, zamenjan vzorec, neprimeren transport vzorca, prisotnost bioloških in nebioloških zaviralcev pomnoževanja DNK v vzorcu, napaka izvajalca testiranja, zamenjava izvida, neprimerno razumevanje rezultata testa.

Podobno kot drugi mikrobiološki testi, ki jih uporabljamo v medicini, mora vsak nov test za dokazovanje DNK HPV, ki naj bi ga uporabljali v klinični praksi, izpolnjevati dogovorjene standarde za klinično specifičnost in občutljivost. Da bi olajšali evalvacijo in uvedbo novih komercialno dostopnih testov za dokazovanje DNK HPV, so leta 2009 objavili mednarodna strokovna priporočila o tem, kako ustrezno ovrednotiti novo razvite teste za dokazovanje DNK HPV predvsem za varno uporabo v primarnem presejalnem testiranju za zgodnje odkrivanje RMV ter za druge klinične indikacije (2). Mednarodna priporočila (t.i. smernice po Meijer-ju) temeljijo na tem, da morajo testi za dokazovanje DNK HPV izpolnjevati vse dogovorjene standarde za klinično občutljivost, klinično specifičnost in znotraj- in med-laboratorijsko ponovljivost (2), medtem ko se lahko razlikujejo glede na tehnologijo testiranja, stopnjo avtomatizacije, materialne stroške testiranja in sposobnost analize različno velikega števila vzorcev.

Poleg smernic po Meijer-ju, obstaja še velik akademski projekt, ki je klinično ovrednotil in še vedno vrednoti številne teste za dokazovanje DNK HPV za varno uporabo v presejalnem testiranju za zgodnje odkrivanje RMV (4). Projekt VALGENT (angl. clinical VALidation of human papillomavirus GENotyping Tests) omogoča preverjanje in primerjavo večjega števila testov za dokazovanje DNK HPV na arhivskih vzorcih brisov materničnega vratu. VALGENT-1, VALGENT-2 in VALGENT-3, ki so potekali na belgijskih, škotskih in slovenskih vzorcih so že zaključeni, medtem ko VALGENT-4 na danskih vzorcih še poteka (4).

Po podatkih zadnjega preglednega članka je bilo na svetovnem tržišču konec 2020 vsaj 254 različnih komercialno dostopnih testov za dokazovanje DNK HPV in vsaj 425 njihovih različic (5). Kljub tako velikem številu le zelo omejen nabor testov za dokazovanje DNK HPV (13–15 testov) izpolnjuje minimalna merila za varno uporabo v klinične namene za vsaj eno od dogovorjenih kliničnih indikacij (5, 6). Poleg tega več kot 60 % testov, ki so trenutno komercialno dostopni, nima niti ene same objave v recenziranih znanstvenih revijah in vsaj 82 % testov, ki so trenutno komercialno dostopni, nima niti ene same objave klinične uporabnosti testa v recenziranih znanstvenih revijah (5). Enotni zaključek vseh strokovnjakov je, da tako komercialno dostopnih testov za DNK HPV kot tistih razvitih v laboratoriju (angl. in-house tests), ki niso bili ustrezno klinično preverjeni, ne smemo uporabljati v klinični praksi (1–6). Zaradi pomanjkanja predpisov in slabega nadzora na tem področju se na žalost po vsem svetu v vsakdanji praksi uporabljajo številni testi za dokazovanje DNK HPV, ki niso klinično preverjeni (6). To se na srečo v Sloveniji zaenkrat ne dogaja in močno upamo, da bo tako ostalo tudi v prihodnje. Poleg tega večina testov za dokazovanje DNK HPV, ki so trenutno na trgu, niso popolni diagnostični testi, saj ne vsebujejo reagentov za ekstrakcijo nukleinskih kislin iz vzorca, in pri večini testov priporočen postopek ekstrakcije nukleinskih kislin ni niti omejen v navodilih proizvajalca testa (5). Poleg tega le manjšina testov na trgu vsebuje t.i. interno kontrolo, s katero preprečujemo pojav napačno negativnih rezultatov (5).

Že pred pandemijo COVID-19 so se strokovnjaki strinjali, da bi se morali proizvajalci testov HPV namesto na izdelavo popolnoma novih testov osredotočiti predvsem na klinične validacije že obstoječih testov za dokazovanje DNK HPV in njihove nadaljnje izboljšave, s katerimi bi dosegli optimalno ravnovesje med klinično občutljivostjo in klinično specifičnostjo testov (6). Žal je pandemija COVID-19 še dodatno negativno vplivala na prav vse segmente zdravstva in gospodarstva po celem svetu, vključno tudi z dolgotnim načrtovanim uvajanjem testov za dokazovanje DNK HPV v presejanje RMV ter triažo (7, 8). Kljub vsem negativnim vidikom pandemije COVID-19 je pomembno poudariti, da pandemija COVID-19 lahko ustvari tudi nove priložnosti za učinkovitejše preprečevanje RMV: s spodbujanjem stroškovno učinkovitejših, na dokazih temelječih postopkih presejanja, s poudarkom na presejanju žensk, ki imajo najvišje tveganje za RMV, spodbujanjem testiranja na DNK HPV na samoodvzetih vzorcih ter odvratanju od neučinkovitih in finančno potratnih presejalnih politik,

npr. istočasnega presejanja z dvema testoma (citologijo in HPV) (7, 8).

Testi za dokazovanje RNK HPV v presejanju RMV

Okužbo s HPV lahko zaznamo tudi z dokazovanjem virusne informacijske RNK (iRNK). Medtem ko je razvitih na stotine testov DNK HPV, le redki dokazujejo iRNK HPV (5). Le en test HPV, ki dokazuje iRNA za beljakovini E6/E7 štirinajstih genotipov HPV (*APTIMA HPV Assay*), je odobrila ameriška agencija za prehrano in zdravila (FDA) za presejanje RMV, ampak le v kombinaciji s citologijo. Mednarodnih smernic, ki bi opredeljevale način kliničnega preverjanja meril za presejalne teste HPV, ki temeljijo na dokazovanju iRNK tudi še vedno ni. Zaradi navedenih razlogov je vprašanje, ali so testi za dokazovanje iRNK HPV enakovredni testom za dokazovanje DNK HPV v presejanju RMV eno od najbolj perečih, ki resno buri duhove in že kar nekaj let pomembno razdvaja skupnost HPV. Rezultati zadnje, še neobjavljene metaanalize nakazujejo, da je test *APTIMA* nekoliko manj občutljiv, vendar pomembno bolj specifičen za odkrivanje CIN2+ v primerjavi s klinično validiranimi testi za dokazovanje DNK HPV, medtem ko za CIN3+ ni bilo pomembne razlike v občutljivosti. Vendar to velja le za brise materničnega vratu odvzete pri ginekologu, rezultati testa *APTIMA* so namreč na samoodvzetih vzorcih pomembno slabši, v primerjavi s klinično validiranimi testi za dokazovanje DNK HPV. Večletna kumulativna incidenca CIN2+ in CIN3+ po izhodiščnem negativnem rezultatu testa *APTIMA* se pomembno razlikuje v različnih raziskavah, z najbolj obetajočimi rezultati pridobljenimi le pred kratkim (9). Po dosegljivih podatkih se test *APTIMA* v organiziranem presejanju RMV trenutno uporablja le na Škotskem in v Walesu ter nekaterih drugih območjih Velike Britanije.

Triaža žensk s pozitivnim izvidom presejalnega testa HPV z delno genotipizacijo HPV

Izsledki dosedanjih raziskav in praktičnih izkušenj v nekaterih državah kažejo, da je delna ali razširjena genotipizacija HPV lahko ena izmed možnosti za triažo žensk s pozitivnim izvidom presejalnega testa HPV (bodisi DNK ali RNK), s katero zanesljivo odkrijemo ženske, ki imajo največje tveganje za nastanek predrakavih sprememb in RMV in potrebujejo takojšnjo diagnostično obravnavo in v veliki večini primerov tudi takojšnje zdravljenje. Na podlagi številnih raziskav se je najprej uveljavil algoritem primarnega presejalnega testiranja za zgodnje odkrivanje RMV z

uporabo testov HPV, ki omogočajo hkratno genotipizacijo za HPV16 in HPV18. Algoritem je odobrila tudi FDA. Tako se v ZDA ženske, ki imajo dokazano okužbo s HPV16 in/ali HPV18 nemudoma napoti na kolposkopijo, ženske z dokazano okužbo z ostalimi 12-timi genotipi HPV pa se obravnava glede na citološki izvid, in sicer se jih v primeru normalne citologije pokliče na kontrolni pregled čez eno leto, v primeru patološke citologije pa se jih takoj pokliče na kolposkopijo (10). Podoben način presajanja RMV in triaže se uporablja tudi v avstralskem presejalnem programu. Nasprotno, v nizozemskem programu presejanja RMV, čeprav v presejanju uporabljajo test HPV s hkratno genotipizacijo za HPV16 in HPV18, triaža temelji le na citologiji. Raziskava na populaciji več kot 4.000 žensk iz Slovenije v kateri smo ženske dvakrat v treh letih hkrati presejali s testom DNK HPV in citologijo, je pokazala, da bi podobna strategija presejanja in triaže lahko delovala tudi v našem prostoru (11). V prvem krogu raziskave smo tako ugotovili CIN2+ pri 20,4 % (95 % IZ = 14,6 % - 27,7 %) HPV16/HPV18 pozitivnih žensk in le v 7,0 % (95 % IZ = 4,6 % - 10,2 %) žensk okuženih z ostalimi onkogenimi genotipi HPV. Skupno (v prvem in drugem krogu presejanja) smo ugotovili CIN2+ pri 30,5 % (95 % IZ = 23,1 % - 39,5 %) HPV16/HPV18 pozitivnih žensk in pri 13,2 % (95 % IZ = 9,5 % - 17,7 %) žensk okuženih z ostalimi onkogenimi genotipi HPV. Podobno razliko smo ugotovili tudi pri CIN3+ (11).

Ker imata okužbi s HPV31 in HPV33 večjo ali vsaj enako pozitivno napovedno vrednost za CIN2+ in CIN3+ kot okužba s HPV18, v novejšem času predlagajo dopolnitev algoritma delne genotipizacije (samo za HPV16 in HPV18) s posameznim ločevanjem ostalih dveh do štirih najpomembnejših genotipov, ali z razvrščanjem genotipov HPV v pet do devet skupin glede na ocenjeno tveganje ali t.i. razširjeno genotipizacijo HPV (12). Vodilni testi za dokazovanje DNK HPV na trgu imajo različne možnosti za razširjeno genotipizacijo, tako trenutno ni konsenza, kako naj bi razširjeno genotipizacijo HPV uporabljali za triažo žensk s pozitivnim izvidom presejalnega testa HPV (5, 6).

Triaža žensk s pozitivnim izvidom presejalnega testa HPV z drugimi molekularnimi testi

Najpogostejši načini triaže žensk s pozitivnim izvidom presejalnega testa HPV, ki se trenutno rutinsko uporabljajo po svetu so: citologija, delna ali razširjena genotipizacija HPV ter barvanje na prisotnost p16^{INK4a} in ki-67. Več kot desetletje se preizkušajo tudi druge triažne metode, med katerimi se zdi najbolj obetajoča metilacija določenih človeških genov

in/ali genov HPV, čeprav se zaenkrat po dosegljivih podatkih metilacije rutinsko ne uporablja v nobenem organiziranem presejalnem programu (13–15). Metilacijo odlikuje visoka ponovljivost, objektivnost in uporabnost tako pri brisih materničnega vratu odvzetih pri ginekologu, kot na samoodvzetih vzorcih (13). Od številnih preizkušenih kombinacij največ obetajo: (i) *FAM19A4* in/ali *miR124-2*, (ii) *CADM1* in/ali *MAL* in/ali *miR124-2*, (iii) *EPB41L3*, (iv) *DLX1*, *ITGA4*, *RXFP3*, *SOX17* in *ZNF671* in/ali *ASTN1*, (v) *POU4F3* ter (vi) *PAX1* (13). Najdaljša večletna kumulativna incidenca CIN3+ po izhodiščnem negativnem rezultatu metilacijskega testa (14 let) je določena za kombinacijo *FAM19A4/miR124-2* in je podobna kot po negativni triažni citologiji, kumulativna incidenca RMV po izhodiščnem negativnem rezultatu metilacijskega testa pa je pomembno nižja kot po negativni triažni citologiji (16). Uporabnost kombinacije *FAM19A4/miR124-2* v triaži žensk s pozitivnim izvidom presejalnega testa HPV je bila potrjena tudi v več evropskih multicentričnih raziskavah, v katerih redno sodelujemo tudi slovenski raziskovalci (17–21).

Literatura

- Arbyn M, Gultekin M, Morice P, Nieminen P, Cruickshank M, Poortmans P, et al. The European response to the WHO call to eliminate cervical cancer as a public health problem. *Int J Cancer*. 2021;148(2):277–84.
- Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009;124(3):516–20.
- Kyrgiou M, Arbyn M, Bergeron C, Bosch FX, Dillner J, Jit M, et al. Cervical screening: ESGO-EFC position paper of the European Society of Gynecologic Oncology (ESGO) and the European Federation of Colposcopy (EFC). *Br J Cancer* 2020;123(5):510–7.
- Arbyn M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Cuschieri K, Schmitt M, et al. VALGENT: A protocol for clinical validation of human papillomavirus assays. *J Clin Virol*. 2016;76 Suppl 1:S14–21.
- Poljak M, Oštrbenk Valenčak A, Gimpelj Domjanič G, Xu L, Arbyn M. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(9):1144–50.
- Arbyn M, Simon M, Peeters E, Xu L, Meijer CJLM, Berkhof J, et al. 2020 list of human papillomavirus assays suitable for primary cervical cancer screening. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(8):1083–95.
- Arbyn M, Bruni L, Kelly D, Basu P, Poljak M, Gultekin M, et al. Tackling cervical cancer in Europe amidst the COVID-19 pandemic. *Lancet Public Health*. 2020;5(8):e425.
- Poljak M, Cuschieri K, Waheed DE, Baay M, Vorsters A. Impact of the COVID-19 pandemic on human papillomavirus-based testing services to support cervical cancer screening. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 2021;30(1):21–6.
- Strang THR, Gottschlich A, Cook DA, Smith LW, Gondara L, Franco E, et al. Long-term cervical precancer outcomes after a negative DNA- or RNA-based human papillomavirus test result. *Am J Obstet Gynecol*. In press 2021.
- Huh WK, Ault KA, Chelmow D, Davey DD, Goulart RA, Garcia FA, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *Gynecol Oncol*. 2015;136(2):178–82.
- Poljak M, Oštrbenk A, Seme K, Šterbenc A, Jančar N, Vrtačnik Bokal E. Three-year longitudinal data on the clinical performance of the Abbott RealTime High Risk HPV test in a cervical cancer screening setting. *J Clin Virol*. 2016;76:(Suppl 1):S29-S9.
- Cuzick J, Wheeler C. Need for expanded HPV genotyping for cervical screening. *Papillomavirus Res*. 2016;2(12):112-5.
- Kremer WW, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Kenter GG, Meijer CJLM. The use of host cell DNA methylation analysis in the detection and management of women with advanced cervical intraepithelial neoplasia: a review. *BJOG*. 2021;128(3):504–14.
- Onyango CG, Ogonda L, Guyah B, Shiluli C, Ganda G, Orang'o OE, et al. Novel biomarkers with promising benefits for diagnosis of cervical neoplasia: a systematic review. *Infect Agents Cancer*. 2020;15(1):68.
- Shiraz A, Crawford R, Egawa N, Griffin H, Doorbar J. The early detection of cervical cancer. The current and changing landscape of cervical disease detection. *Cytopathology*. 2020;31(4):258–70.
- De Strooper LMA, Berkhof J, Steenbergen RDM, Lissenberg-Witte BI, Snijders PJF, Meijer C, et al. 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):1541–8.
- Vink FJ, Dick S, Heideman DAM, de Strooper LMA, Steenbergen RDM, Lissenberg-Witte BI, et al. Classification of high-grade CIN by p16ink4a, Ki-67, HPV E4 and *FAM19A4/miR124-2* methylation status demonstrates considerable heterogeneity with potential consequences for management. *Int J Cancer*. 2021;149(3):707-16.
- Bonde J, Floore A, Ejegod D, Vink FJ, Hesselink A, van de Ven PM, et al. 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.
- Vink FJ, Meijer CJLM, Clifford GM, Poljak M, Oštrbenk A, et al. *FAM19A4/miR124-2* methylation in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. *Int J Cancer*. 2020;147(4):1215–21.

20. Floore A, Hesselink A, Oštrbenk A, Alcaniz E, Rothe B, Pedersen H, et al. 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.
21. van Leeuwen RW, Oštrbenk A, Poljak M, van der Zee AGJ, Schuurung E, Wisman GBA. DNA methylation markers as a triage test for identification of cervical lesions in a high risk human papillomavirus positive population-based screening cohort. *Int J Cancer.* 2019;144(4):746-54.