

Umestitev tekočinske citologije v program ZORA: predstavitev pilotne raziskave

Veronika Kloboves Prevodnik¹, Mario Poljak², Anja Oštrbenk Valenčak², Jerneja Varl¹, Margareta Strojjan Fležar³, Špela Smrkolj⁴, Urška Gašper Oblak⁵, Leon Meglič⁴, Maja Primic Žakelj⁶ in Urška Ivanuš⁶

¹Oddelek za citopatologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, Ljubljana

²Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, Ljubljana

³Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, Ljubljana

⁴Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, Ljubljana

⁵ZD Ljubljana Moste-Polje enota Fužine, Preglov trg 14, Ljubljana

⁶Državni program ZORA, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, Ljubljana

Povzetek

Državni presejalni program ZORA je od leta 2003 prepolovil incidenco raka materničnega vratu (RMV) med slovenskimi ženskami. Zaradi odlične kakovosti in rezultatov konvencionalne citologije do sedaj ni bilo potrebe po spremembi presejalne politike. Zaradi novih evropskih smernic in vstopa prvih generacij deklic, cepljenih proti HPV v program pa se moramo tudi v Sloveniji počasi pripraviti na prehod na primarno HPV presejanje vsaj za del presejalne populacije. Glavna prednost testa HPV je boljša občutljivost za odkrivanje predrakavih sprememb (CIN2+) in večja varnost pred RMV v primerjavi s citologijo. Vendar pa visoka občutljivost testa lahko vodi v odkrivanje prehodnih in klinično nepomembnih HPV okužb, kar zniža specifičnost presejanja. Tudi zaradi tega evropske smernice svetujejo, da se pri uvedbi primarnega HPV presejanja uvede tudi refleksno triažno testiranje, ki omogoča izvedbo presejalnega in triažnega testiranja iz istega vzorca. V Sloveniji z obstoječo tehnologijo, ki jo uporabljamo v programu ZORA, tega trenutno ni mogoče izvesti. Zato je pred uvedbo primarnega HPV presejanja nujna uvedba tekočinske citologije (TC), pri kateri se celice namesto na steklo prenesejo v tekočinski medij. Takšen odvzem in shranjevanje vzorca nam omogoči, da se na enem vzorcu izvede več različnih testov. Kljub temu moramo biti pri uvedbi TC previdni, ker se morfološke značilnosti celic v preparatih TC in konvencionalne citologije razlikujejo, kar lahko vpliva na pravilnost ocene celičnih sprememb. Z uvedbo TC v Sloveniji in v programu ZORA se občutljivost in specifičnost citologije za odkrivanje CIN2+ ne smeta zmanjšati, saj bi s tem lahko ogrozili zdravje slovenskih žensk in dobre rezultate programa ZORA. Zato je nujno slovenske presejalce in citopatologe izšolati za ocenjevanje preparatov, narejenih iz tekočinskega vzorca. S tem namenom pripravljamo pilotni projekt, s katerim želimo ocenjevanje TC varno umestiti v vse citopatološke laboratorije, ki sodelujejo v državnem programu ZORA.

Ključne besede: presejanje RMV, program ZORA, tekočinska citologija, pilotna raziskava

Uvod

V Sloveniji že od leta 2003 deluje državni presejalni program ZORA, ki je s preventivnimi pregledi celic v brisu materničnega vratu (BMV) in zdravljenjem predrakavih sprememb zmanjšal incidenco raka materničnega vratu za polovico (1). Trenutno se v večini presejalnih programov kot presejalni test uporablja citološki pregled BMV, v katerem se iščejo maligne celice in celice s predrakavimi spremembami. Gine

kolog s posebnim loparčkom in krtačko odvzame celice transformacijske cone materničnega vratu in dodatno materničnega kanala, da pridobi vzorec, ki ga razmaže na objektno stekelce. Z mikroskopskim pregledom na stekelcih fiksiranih in obarvanih celic je mogoče odkriti celične spremembe, ki bi lahko vodile v razvoj raka materničnega vratu (2). Čeprav je citološka ocena BMV dolgo časa veljala za zlati standard v presejalnih programih, ima določene omejitve, ki

jih je delno mogoče premostiti s ponavljanjem testiranja vsake 3 leta. Glavna pomanjkljivost pregleda BMV je majhna občutljivost (povprečna 53%) za odkrivanje predrakavih sprememb (CIN2+) (3). To je lahko posledica neustrezno odvzetega vzorca, neustrezne priprave preparata ali napačne interpretacije (4). Poleg tega so citološke ocene za spremembe nizke stopnje slabo ponovljive in imajo nizko stopnjo strinjanja, celo med strokovnjaki v kakovostnih, nadzorovanih presejalnih programih (5). Da bi premostili te pomanjkljivosti, so raziskovalci začeli razvijati nove metode, kot je tekočinska citologija (TC). Pri TC se celice namesto na steklo prenesejo v tekočinski medij. Po svoji sestavi je medij fiksativ, ki v veliki meri ohrani morfološke, antigenske in molekularne lastnosti celic. Celice, suspendirane v mediju, se nato z metodo filtracije ali sedimentacije v posebnem aparatu nanesejo na stekelca in pobarvajo po metodi Papanicolaou. TC zmanjša kontaminacijo vzorca s krvnimi celicami, sluzjo in gnojem, kar dokazano zmanjša število neuporabnih vzorcev. Dodatna prednost TC je tem, da je mogoče opraviti več testov na istem vzorcu (npr. HPV test), kar zmanjša stroške in obseg dela. Najpogostejša medija, ki se uporabljata pri metodi TC, sta ThinPrep (Hologic, Marlborough, MA, ZDA) in BD SurePath (BD, Franklin Lakes, NJ, ZDA). Od nedavnega sta na tržišču še medija Roche Cell Collection Medium podjetja Roche (Basel, Švica) ter NOVAprep podjetja Novacyt (Vélizy-Villacoublay, Francija). Številne raziskave so že primerjale TC s konvencionalno citologijo, vendar so bile večinoma izvedene na vzorcih, shranjenih v ThinPrep ali SurePath mediju. V teh raziskavah so ugotovili, da uporaba TC zmanjša število neuporabnih vzorcev, nima pa večjega učinka na občutljivost in specifičnost. Nizka občutljivost je tako še vedno glavna omejitev tako konvencionalne kot tekočinske citologije (6). Dodatna omejitev je slaba ponovljivost rezultatov, ki je posledica razlik v ocenjevanju morfoloških lastnosti preparatov, tako med laboratoriji kot med ocenjevalci. Zato se občutljivost in specifičnost citologije pomembno razlikujeta med različnimi laboratoriji in med ocenjevalci. Zaključki nedavne raziskave o rezultatih konvencionalne citologije v evropskih in severno ameriških državah so pokazali, da je povprečna občutljivost enega testa za odkrivanje CIN2+ 53 %, vendar z zelo visoko specifičnostjo. Majhna občutljivost testa je posledica variabilnosti med državami in se giblje od 18,6 % v Nemčiji in 76,7 % v Veliki Britaniji (7). Ti rezultati so skladni z nedavno raziskavo, ki je pokazala, da je občutljivost citologije za odkrivanje CIN2+ v Sloveniji 66,2 % (8). To pomeni, da v deželah z nizko občutljivostjo citologije predrakave in rakave spremembe na materničnem vratu spregledajo pri

približno polovici žensk, ki te spremembe že imajo. Zato je citologijo v presejalnih programih nujno potrebno večkrat ponoviti v ustreznih presejalnih intervalih, ki naj ne bi bili krajši od treh let. Na tak način se občutljivost citologije poveča na okoli 70–80 %, specifičnost pa se pomembno ne zmanjša.

Odkritje, da je okužba z visokotveganimi človeškimi papilomavirusi (HPV) nujen vendar nezadosten pogoj za razvoj RMV, je omogočilo razvoj številnih molekularnih testov (9) in alternativo citologiji kot primarni presejalni test. V randomiziranih kliničnih poskusih in metaanalizah so ugotovili, da ima HPV-testiranje višjo občutljivost za CIN2+ in ponuja večjo in daljšo varnost pred RMV v primerjavi s citologijo (10, 11). Tako so leta 2015 izšle dopolnitve Evropskih smernice za zagotavljanje kakovosti v presejanju za raka materničnega vratu (angl. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening), v katerih se državam članicam Evropske zveze priporoča presojo spremembe presejalne politike v organiziranih presejalnih programih za raka materničnega vratu, in sicer tako, da se pri ženskah (starejših od 35 let in cepljenih proti okužbi s HPV) namesto citološkega pregleda BMV uporabi test HPV (12). Vendar visoka občutljivost testa HPV vodi v odkrivanje prehodnih in klinično nepomembnih HPV okužb, ki ne predstavljajo večjega tveganja za razvoj RMV. Nižjo specifičnost HPV testov (11) lahko povečamo z uporabo triažnih testov, ki izmed vseh HPV pozitivnih žensk odkrijejo tiste z večjim tveganjem RMV. Med trenutno najbolj preučevane triažne metode sodijo: refleksna citologija, dvojno p16/Ki-67 imunocitokemično barvanje (ICK), genotipizacija HPV16/HPV18, metilacija in drugi obetavni molekularni testi (13). Omenjene evropske smernice priporočajo refleksno testiranje, ki omogoča izvedbo presejalnega in triažnega testiranja iz istega vzorca, s čimer znižamo stroške, število (ne)potrebnih pregledov ter kolposkopij in obremenitev žensk, ki se udeležujejo preventivnih programov (12).

V Sloveniji je konvencionalna citologija zelo kakovostna (delež uporabnih brisov znaša 99.9% (1)) in do nedavnega ni bilo potrebe po vpeljavi TC. Zaradi novih evropskih smernic, ki priporočajo uvedbo primarnega HPV testiranja v organizirane presejalne programe (12), in zaradi vstopa prvih generacij deklic, cepljenih proti HPV v program ZORA, se moramo tudi v Sloveniji pripraviti na spremembo presejalne politike za odkrivanje raka materničnega vratu in morebitno uvedbo primarnega presejanja s testom HPV pri izbranih ženskah. Prvi korak predstavlja uvedba

tekočinske namesto trenutne konvencionalne citologije, ki bo omogočila refleksno testiranje, kar je predpogoj za uvedbo primarnega HPV testiranja. Pri tem moramo biti previdni, ker se morfološke značilnosti celic v preparatih TC in konvencionalne citologije razlikujejo, kar lahko vpliva na pravilnost ocene celičnih sprememb. Zato je nujno slovenske presejalce in citopatologe pred uvedbo TC izšolati za ocenjevanje preparatov, pripravljenih iz tekočinskega vzorca. Izkušnje iz tujine kažejo, da se ob prehodu na tekočinsko citologijo lahko zmanjšata tako občutljivost kot predvsem specifičnost, še posebej, če so bili rezultati konvencionalne citologije zelo dobri. Z uvedbo TC v Slovenijo in v program ZORA se občutljivost in specifičnost citologije za odkrivanje CIN2+ ne smeta zmanjšati, saj bi s tem ogrozili zdravje slovenskih žensk in dobre rezultate programa ZORA. Zato pripravljamo pilotni projekt, s katerim želimo ocenjevanje TC varno umestiti v vse citopatološke laboratorije, ki sodelujejo v državnem programu ZORA.

Drugi korak verjetne spremembe presejalne politike bo predstavljala uvedba primarnega HPV testiranja in izbor ustrezne triažne metode. Trenutno ni priporočene, enotne triažne metode, s katerim bi HPV pozitivne ženske ali napotili na kolposkopijo ali vrnili nazaj v rutinsko presejanje. Izbira ustreznega testa HPV in triažna strategije za HPV pozitivne ženske ostaja eno izmed ključnih vprašanj, s katerimi se trenutno soočajo države pri spremembah presejalnih programov (13). V ta namen bo pilotnemu projektu za umestitev TC sledil še drugi del raziskave, v katerem bomo v komercialno dostopnih medijih za tekočinsko citologijo preverjali zanesljivost različnih testov HPV in ustreznost in možnost izvedbe različnih triažnih strategij.

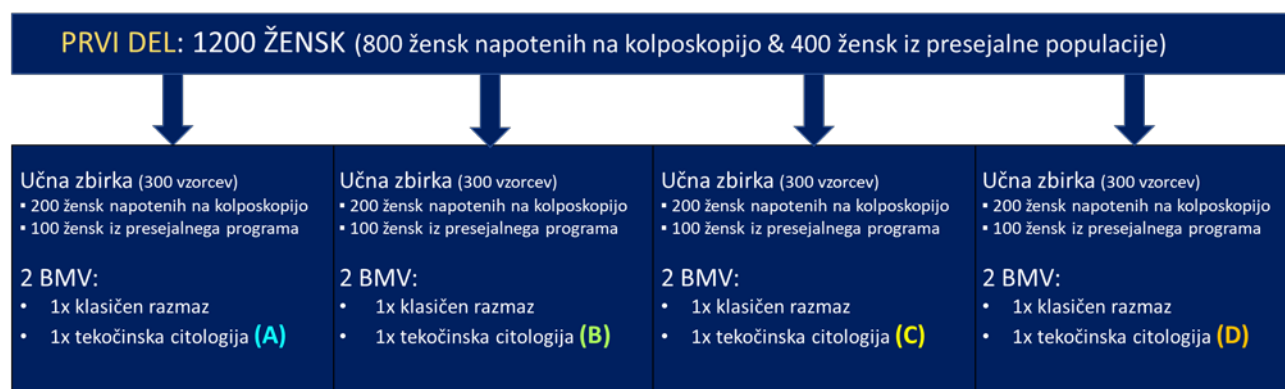
Materiali in metode

Načrt raziskave: V prvi del raziskave bomo vključili

1.200 žensk, od tega 800 žensk, ki bodo v skladu s slovenskimi smernicami napotene na kolposkopijo, in 400 žensk, ki bodo v skladu s smernicami prišle na redni presejalni pregled ZORA (14). Ginekolog bo vsaki ženski, ki bo prostovoljno pristala na sodelovanje v raziskavi, odvzel dva BMV, enega za klasično citologijo in drugega za TC. Predvidevamo, da bomo v raziskavo vključili štiri vrste transportnih medijev in za vsako vrsto medija pridobili 300 vzorcev (Slika 1). Iz vsakega vzorca TC bomo nato z ustreznim aparatom za pripravo vzorcev TC pripravili en preparat za citološko oceno in enega za validacijo dvojnega p16/Ki-67 ICK barvanja. Preostanek vzorca bomo razdelili na manjše dele (aliquotirali) in jih shranili na -70°C za nadaljnje raziskave. Vse ženske, ki bodo sodelovale v raziskavi, bodo podpisale Izjavo o zavestni in svobodni privolitvi za sodelovanje v raziskavi po pojasnilu. Protokol raziskave je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 0120-329/2019/8).

Odvzem vzorcev: Ginekolog bo ženskam, ki bodo prišle na odvzem presejalnega BMV ali bodo v skladu s smernicami napotene v kolposkopsko ambulanto, odvzel dva BMV. Iz prvega BMV bo naredil dva klasična razmaza in ju fiksiral z MercoFix (Merck) pršilom. Drugi BMV bo dal v enega od štirih transportnih medijev, ki jih bomo testirali v raziskavi. Za vsak transportni medij bomo pridobili 300 vzorcev.

Priprava vzorcev TC za citologijo: Iz vsakega vzorca bomo na ustreznem aparatu naredili citološke preparate po navodilih proizvajalca. Predvidevamo, da bomo uporabili tri vrste aparatov, enega firme Hologic (Marlborough, Massachusetts, ZDA), drugega Novacyt (Vélizy-Villacoublay, Francija) in tretjega BD Totalys SlidePrep (BD Diagnostics, Burlington, North Carolina, ZDA) Priprava preparatov TC bo potekala na Onkološkem inštitutu Ljubljana (OIL).



Slika 1. Shematični prikaz prvega dela pilotne raziskave za umestitev tekočinske citologije v državni presejalni program ZORA.

Barvanje po Papanicolaou: Preparate za citološko oceno, ki jih bomo naredili z aparatom firme Hologic ali Novacyt, bomo pobarvali po metodi Papanicolaou, ki se uporablja rutinsko na Onkološkem inštitutu Ljubljana ali po navodilih proizvajalca v barvalcu Leica ST5020 Multistainer (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Preparati, ki jih bomo naredili z aparatom BD Totalys SlidePrep (BD Diagnostics, Burlington, NC) se bodo pobarvali v samem aparatu. Barvanje po Papanicolaou bo potekalo na OIL.

Validacija dvojnega p16/Ki-67 ICK barvanja: Za validacijo bomo uporabili test CINteck plus (Roche, Basel, Švica). Za vsak transportni medij bomo validacijo izvedli na 20 vzorcih. Preparate konvencionalne in TC bomo barvali v skladu z navodili proizvajalca na barvalcu Bench Mark ULTRA ali BechMark XT (Roche, Basel, Švica) na OIL.

Ocena citoloških vzorcev in napotitev na nadaljnjo obravnavo: K sodelovanju v raziskavi bodo povabljeni vsi presejalci in citopatologi, ki sodelujejo v DP ZORA. Pred začetkom raziskave se bodo udeležili šolanja za oceno preparatov TC, ki ga bomo organizirali na sedežu programa ZORA. Preparate TC bodo ocenjevali na enak način kot konvencionalne BMV. Imeli bodo podatke o starosti ženske, menstruacijskem ciklusu in razlogih za odvzem BMV. Po zaključenem ocenjevanju bomo za vse ocenjevalce preverili skladnost citoloških ocen med ocenjevalci in laboratoriji ter ocenili zanesljivost testa za detekcijo CIN2+. Ženske bodo na nadaljnjo obravnavo napotene v skladu s smernicami, obravnava žensk se zaradi sodelovanja v prvem delu raziskave ne bo spremenila. Ocenjevanje preparatov TC bo potekalo v vseh citopatoloških laboratorijih, ki so vključeni v DP ZORA.

Shranjevanje vzorcev: Ostanke vzorcev TC bomo razdelili na manjše dele in jih shranili na -70°C. Razdelitev in shranjevanje vzorcev bo potekalo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Statistična obdelava: Uporabili bomo osnovne statistične metode, metode za ocenjevanje ujemanja rezultatov testov v različnih medijih, mere veljavnosti testov in medijev za CIN2+ in CIN3+ (občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost), primerjali bomo rezultate različnih testov in medijev, ter opravili stratificirane analize glede na starost in druge pomembne napovedne dejavnike za opazovani izid.

Pričakovani rezultati

Pričakujemo:

- da se citološke ocene preparatov tekočinske citologije ne bodo bistveno razlikovale od klasične citologije;
- da bo citološko ocenjevanje preparatov tekočinske citologije enako zahtevno za vse testirane komercialno dostopne transportne medije;
- da se bodo sistemi za pripravo preparatov razlikovali v predpisanih protokolih, v času potrebem za pripravo vzorca in nivoju avtomatizacije;
- da bo volumen testiranih transportnih medijev zadosten za izvedbo naslednjih triažnih testov: citologija, p16/Ki-67 dvojno imunocitokemično barvanje, več različnih testov HPV z različnimi nivoji genotipizacije in metilacijski testi;
- da se učinkovitost citologije, p16/Ki-67 dvojnega imunocitokemičnega barvanja, testa(ov) HPV z genotipizacijo in metilacija DNA ne bo razlikovala med testiranimi komercialno dostopnimi transportnimi mediji.

Literatura

1. National Cervical Cancer Screening Programme ZORA. (Slovenian): DP ZORA: Kazalniki. (online); <https://zora.onko-i.si/https://zora.onko-i.si/publikacije/kazalniki/> (Accessed 2018 Mar 29).
2. Bengtsson E, Malm P: Screening for cervical cancer using automated analysis of PAP-smears. *Comput Math Methods Med.* 2014; 2014: 842037.
3. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al: Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International journal of cancer.* 2006; 119: 1095-101.
4. Siebers AG, Klinkhamer PJ, Grefte JM, Massuger LF, Vedder JE, Beijers-Broos A, Bulten J, Arbyn M: Comparison of liquid-based cytology with conventional cytology for detection of cervical cancer precursors: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2009; 302(16):1757-64. doi: 10.1001/jama.2009.1569.
5. Feldman S: Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening: is it time to abandon Papanicolaou testing? *JAMA Intern Med.* 2014; 174: 1539-40.
6. Sigurdsson K: Is a liquid-based cytology more sensitive than a conventional Pap smear? *Cytopathology.* 2013; 24: 254-63.
7. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al: Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International journal of cancer.* 2006; 119: 1095-101.
8. Poljak M, Ostrbenk A, Seme K, Sterbenc A, Jancar N, Vrtacnik 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:S29 –S39.
9. zurHausen H: Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 1996; 1288: F55-F78.
 10. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ; International HPV screening working group: Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet.* 2014 Feb 8;383(9916):524-32.
 11. Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, Martin-Hirsch PP, Mustafa RA, Schünemann H, Paraskevidis E, Arbyn M; Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; CD008587. doi: 10.1002/14651858.CD008587.pub2.
 12. von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancers screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Res* 2015; 1: 22-31.
 13. Cuschieri K, Ronco G, Lorincz A, Smith L, Ogilvie G, Mirabello L, Carozzi F, Cubie H, Wentzensen N, Snijders P, Arbyn M, Monsonego J, Franceschi S. Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs. *Int J Cancer.* 2018; 143(4) :735-745. doi: 10.1002/ijc.31261.
 14. Ursic-Vrscaj M, Rakar S, Možina A, Kobal B, Takač I, Deisinger I, Ursic-Vrscaj M. (Slovenian) editor. Ljubljana; Institute of Oncology Ljubljana: 2011. (Guidelines for management of women with cervical precancerous lesions) https://zora.onko-i.si/fileadmin/user_upload/dokumenti/strokovna_priporocila/2011_Smernice_web.pdf (cited 2018 Mar 15).