

Nove triažne metode pri HPV-pozitivnih ženskah

Ana Pogačnik¹, Veronika Kloboves Prevodnik¹, Nataša Nolde¹, Srdjan Novaković², Uršula Prošenc Zmrzljak², Marina Grgič², Urška Ivanuš³, Maja Primic Žakelj³

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

²Oddelek za molekularno diagnostiko, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, Ljubljana

³Epidemiologija in register raka, Program in register ZORA, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, Ljubljana

Povzetek

Okužba s humanimi papiloma virusi (HPV) je pogostejša kot so predrakave spremembe ali rak materničnega vratu (RMV). Prav zato so v praksi pomemben izziv HPV-pozitivne ženske z negativnim citološkim izvidom, oziroma brez CIN 2+, ker še vedno ni povsem jasno, kako naj jih obravnavamo. Mednarodna strokovna javnost proučuje različne triažne metode, s katerimi bi prepoznali HPV-pozitivne ženske in jih ločili na tiste z večjim ali manjšim tveganjem CIN 2+ in RMV. Cilj je, da se manj ogrožene HPV-pozitivne ženske varno vrnejo v presejanje, bolj ogrožene pa napotitjo na nadaljno diagnostiko in zdravljenje. Tako v tujini, kot tudi pri nas v raziskavah proučujemo različne metode, tako citološke kot molekularne, vendar vse še niso preverjene na velikih populacijskih vzorcih. V prispevku so predstavljene metode, ki se bodo morda v prihodnje uporabljale za triažo HPV-pozitivnih žensk.

Ključne besede: proteinski označevalec, molekularni označevalec, bris materničnega vratu (BMV), humani papiloma virus (HPV), triažne metode, presejalni program

Uvod

Spoznanje, da je okužba z onkogenimi HPV (HPV-VT) nujna vmesna stopnja v naravnem poteku nastanka predrakavih in rakavih sprememb materničnega vratu (1–4), je odprlo nove možnosti za pravočasno prepoznavo bolj ogroženih žensk v že obstoječih organiziranih presejalnih programih. Po podatkih iz literature je mogoče s HPV-testiranjem v primerjavi s citološkim pregledom brisa materničnega vratu (BMV) odkriti okrog 30 % več primerov CIN2+ in 20 % več primerov CIN3+ pri ženskah, ki so starejše od 30 let. Ker so ženske, ki prebolevajo okužbo s HPV-VT, bolj ogrožene z rakom materničnega vratu (RMV) kot ženske, ki te okužbe nimajo, so svoje mesto v presejalnih programih našli presejalni testi za odkrivanje okužb s HPV (PT-HPV). Negativni PT-HPV test je dovolj zanesljiv pokazatelj, da se RMV ne bo razvil v naslednjem desetletju. Klinično preverjeni testi HPV imajo v primerjavi s citološkim pregledom BMV svoje prednosti, kot tudi slabosti (5, 6).

Glavna prednost PT-HPV, ki jo izkoriščamo v presejalnih programih, je njegova velika klinična občutljivost in v primeru, da je test HPV negativen, velika negativna napovedna vrednost za predrakave spremembe visoke stopnje (CIN 2+) in RMV. V primarnem presejanju s testom HPV to omogoča varno podaljšanje presejalnega intervala na 5 let.

Test HPV pa lahko v presejanju uporabimo ne samo kot primarni presejalni test, ampak tudi kot triažni test HPV (TT-HPV) pri ženskah z nekaterimi citološkimi spremembami v BMV. Po slovenskih smernicah za celostno obravnavo žensk s predrakavimi spremembami materničnega vratu je treba TT-HPV opraviti pri ženskah s patološkimi spremembami nizke stopnje in pri ženskah po zdravljenju CIN (7). Če je TT-HPV pri teh ženskah negativen, se lahko praviloma varno vrnejo v presejanje. Tako se je mogoče izogniti prepogostim kontrolnim pregledom in nepotrebni dodatni diagnostiki pri manj ogroženih ženskah. Pomembna prednost testa HPV je tudi, da ga je možno opraviti tudi na cerviko-vaginalnih vzorcih, ki si jih lahko ženske odvzamejo same doma in da je zanesljivost tega testa za odkrivanje CIN 2+ primerljiva zanesljivosti citološkega pregleda BMV, ki ga odvzame ginekolog. Številne države in tudi Slovenija proučujejo možnost, da bi test HPV doma ponudili ženskam, ki se ne udeležujejo redno presejalnih pregledov. Prva država, ki se je odločila za tovrstno nadgradnjo organiziranega presejalnega programa, je Nizozemska.

Prednost testov HPV je v praksi omejena s (pre-)majhno klinično specifičnostjo, kadar se test ne uporablja pri priporočenih indikacijah. Glavna slabost HPV-testiranja je, da odkrije veliko prehodnih okužb, ki lahko spontano izzvenijo. V Sloveniji je v starosti 20–25 let HPV-pozitivnih okoli 25 % žensk

(8). Te ženske spadajo v skupino manj ogroženih žensk, ki ne potrebujejo dodatne diagnostike ali zdravljenja, ker bodo okužbe pri njih v veliki večini primerov spontano izzvenele.

Okužba s HPV je veliko pogostejša, kot so predrakave spremembe ali RMV. Prav zato so v praksi pomemben izziv HPV-pozitivne ženske z negativnim citološkim izvidom, oziroma brez CIN 2+, ker še vedno ni povsem jasno, kako jih obravnavati. Te ženske lahko prebolevajo klinično nepomembno, prehodno okužbo, ali pa klinično pomembno okužbo, ki je v zgodnji fazi in še ne povzroča patoloških sprememb na ploščatem ali žlezem epitelu materničnega vratu. Čeprav imajo te ženske veliko manjše tveganje, da imajo ali bodo v prihodnjih nekaj letih zbolele za RMV, kot ženske z obema pozitivnima testoma, je to tveganje še vedno preveliko, da bi jih lahko varno vrnili v presejanje. V petih letih bo namreč 6 od 100 žensk s HPV pozitivnim testom in negativno citologijo zbolelo s CIN 3+ (9). HPV-pozitivne ženske brez patoloških sprememb odkrijejo predvsem v primarnem presejanju s testom HPV in s citološko triažo, ali pa pri sočasni uporabi testa HPV in pregleda BMV v primarnem presejanju. Ženske so praviloma napotene na kontrolni pregled s testom HPV čez eno leto, saj v tem času lahko okužba bodisi izzveni, ali pa napreduje v CIN, ki ga na kontrolnem pregledu tudi odkrijejo. S tem se sicer prepreči nepotrebno kolposkopsko in histološko diagnostiko v času čakanja ter dopusti okužbi čas, da izzveni. Vendar pa je čakanje za ženske stresno, saj se po eni strani bojijo za svoje zdravje, po drugi strani pa se ukvarjajo s tem, ali naj spremenijo običajno spolno prakso s svojim dolgotrajnim partnerjem, ali lahko zanosijo in podobno. Čakanje je lahko tudi zelo dolgotrajno, saj lahko od okužbe do CIN visoke stopnje mine tudi več let, celo 10 in več (9).

Metode za nadaljnjo triažo HPV pozitivnih žensk

Mednarodna strokovna javnost proučuje različne triažne metode, s katerimi bi prepoznali HPV-pozitivne ženske in jih ločili na tiste z večjim ali manjšim tveganjem CIN 2+ in RMV. Osnovna naloga triažnih metod je ločevanje HPV-pozitivnih žensk na tiste z visokim in tiste z manjšim tveganjem RMV. Cilj je, da se manj ogrožene HPV-pozitivne ženske varno vrne v presejanje, bolj ogrožene pa napoti na nadaljnjo diagnostiko.

Trenutno najpogosteje proučevana triaža je citološki pregled BMV oz. kombinacija citologije in genotipizacije vzorcev za HPV16/18, vendar zaenkrat ta triaža še ne omogoča varne vrnitve HPV-pozitivnih žensk z negativnim triažnim testom v presejanje (10). Zato strokovnjaki s tega področja iščejo nove

metode, ki bi bile primerne za triažo. Proučujejo številne molekularne označevalce, kot so metilacijski status različnih virusnih in humanih genov, in proteinske označevalce, kot so nekateri zaviralni proteini, npr. p16, ali jedrnih proteinov, ki so v celicah, ki proliferirajo (Ki67). Najverjetnejši pristop k celoviti obravnavi žensk iz presejalnih programov pa bo prej ali slej vključeval kombinacijo različnih molekularnih in citoloških metod.

Triaža s citologijo

V svetu potekajo različne raziskave, s katerimi iščejo naprimernejše triažne metode za HPV pozitivne ženske. V presejalni populacijski kohortni študiji VUSA, s katero so preverjali učinkovitost kombinacije citološkega presejanja s HPV-VT testiranjem (Hybrid Capture[®] 2-hc2 test) so ugotovili, da je zelo primerna metoda citološka triaža predvsem v deželah z nizkim odstotkom žensk, ki imajo v brisu materničnega vratu neopredeljene atipične ploščate celice (APC-N) in uporabljajo 5-letni presejalni interval (11). Ugotovili so, da je triaža s citologijo zelo primerna, ker ima veliko negativno napovedno vrednost (NPV) za CIN3+ in se zato z njo zmanjša število nepotrebnih napotitev na kolposkopijo. Razen tega pa sta pomembna tudi neposreden stik in možnost pogovora med ginekologom in žensko. V deželah, kjer je odstotek APC-N velik in so intervali kontrolnih pregledov krajši (3 leta), pa se kot triaža priporoča kombinacija citologije in genotipizacije HPV (na primer določanje bolj invazivnih genotipov 16/18/31/33/45) (11).

Druge metode za triažo HPV pozitivnih žensk

Onkogeni potencial HPV je povezan s produkti virusnih genov E6 in E7. Virusni beljakovini E6 in E7 vplivata na številne celične procese, ki lahko povzročijo maligno spremembo s HPV okuženih celic. Med njimi so napomembnejši: spodbujanje oziroma vzdrževanje celične proliferacije, zaviranje zaščitnega delovanja beljakovin, ki zavirajo rast tumorja ter vzpostavitev celične nesmrtnosti.

Proteinski označevalci

V zadnjem času potekajo številne raziskave, s katerimi iščejo proteine, ki so v predrakavih in rakavih spremembah prekomerno izraženi in kažejo na motnje v celičnem ciklu ali maligno transformacijo celic (proteinski označevalci) in bi se lahko uporabljali za triažo HPV-VT pozitivnih žensk. Med njimi so najbolj raziskovani Ki67, p16, minikromosomski vzdrževalni protein 2 (MCM2) in topoizomeraza 2 alfa (Topo2A). To so proteini, ki so se v različnih raziskavah pokazali kot najbolj zanesljivi pokazatelji predrakavih in rakavih sprememb na materničnem vratu.

P16 je zaviralec kinaz, odvisnih od ciklina, ki je po izsledkih številnih raziskav zelo povečan pri skoraj vseh intraepitelijskih lezijah visoke stopnje in RMV (12–15). V celicah, ki so transformirane zaradi okužbe s HPV-VT, se zaradi nenadzorovane celične delitve poveča izražanje p16-proteina, ki pa zaradi delovanja virusnih proteinov nima vpliva na regulacijo celične delitve in se v celici le kopiči (12). Ki67 pa je protein, ki ga najdemo v jedru in jedrcu celice. Izražen je v vseh celicah, ki proliferirajo, tako normalnih, kot tudi rakasto spremenjenih (16–19). MCM2 in Topo2A sta sta prav tako jedrna proteina, ki se kopičita v celicah, ki so transformirane zaradi okužbe s HPV-VT. Minikromosomski vzdrževalni proteini imajo pomembno vlogo v začetni fazi podvojevanja DNK. Omogočijo vezavo pre-replikacijskega kompleksa na DNK in odvijanje dvojne vijačnice DNK. Topo2A je jedrni encim, ki ima pomembno vlogo med podvojevanjem DNK, kondenzacijo kromosomov, mitozo in pri delitvi kromosomov med dve hčerinski celici (20).

Vsi ti proteinski označevalci se že uporabljajo, saj izboljšajo diagnostično zanesljivost histološke preiskave, tako pri opredelitvi stopnje CIN, kot pri razlikovanju med CIN in spremembami, ki so jim morfološko podobne (18, 20, 21). V raziskavah so se za razlikovanje med neneoplastičnimi in neoplastičnimi spremembami v histološki in v citološki diagnostiki pokazali za boljše in bolj uporabne p16, MCM2 in Topo2A, kot pa Ki67 (20).

Različne raziskave so pokazale, da ima p16 imunocitokemično barvanje zelo veliko občutljivost za ugotavljanje CIN2+ in da bi lahko bilo dober triažni test pri ženskah, ki so imele BMV ocenjen s APC-N ali PIL-NS ali pri tistih s pozitivnim testom HPV (15, 22, 23). Ker pa s p16 imunocitokemičnim barvanjem v BMV prikažemo ne samo celice s predrakavimi in rakavimi spremembami, ampak tudi nekatere normalne celice ter tudi celice z neneoplastičnimi spremembami (endocervikalne celice, ploščatocelična metaplazija, tubarna metaplazija), specifičnost metode ni zadovoljiva.

Ker je posamezen proteinski označevalec Ki67 in p16 premalo specifičen, so razvili dvojno imunocitokemično barvanje p16/Ki67. To barvanje v vzorcih BMV praviloma prikaže le celice s predrakavimi in rakavimi spremembami, zato je test klinično dobro občutljiv in tudi specifičen. Ker se v celicah, ki so transformirane zaradi HPV-VT okužbe prekomerno izražata tako Ki67, kot tudi p16 protein, je p16/Ki-67 dvojno imunocitokemično barvanje pozitivno le v celicah, ki so maligno transformirane, ne pa tudi v normalnih celicah. Imunocitokemično barvanje je pozitivno, če se jedro celice obarva rdeče (Ki67), citoplazma pa rjavo (p16). Za pozitiven

test zadostuje le ena pozitivna celica. Morfološke značilnosti celic pri interpretaciji rezultatov p16/Ki67 dvojnega imunocitokemičnega barvanja niso pomembne, zato je ponovljivost rezultatov dobra (24).

Dosedanje raziskave so pokazale, da bi p16/Ki67 dvojno imunocitokemično barvanje lahko uporabljali kot triažni test v primarnem presejanju z BMV ali s testom HPV, lahko pa bi ga uporabljali tudi kot presejalni test. Petry s sodelavci je v svoji raziskavi pokazal, da s p16/Ki67 dvojnimi imunocitokemičnimi barvanjem z veliko verjetnostjo odkrijemo večje tveganje CIN2+ tudi pri ženskah, ki imajo ob pozitivnem testu HPV negativen izvid BMV (25). Prav te ženske v presejalnih programih predstavljajo izziv za obravnavo, saj je tveganje CIN2+ pri njih preveliko, da bi jih vrnilo v presejanje, zato jih je treba spremljati in čakati, ali bo okužba s HPV izvenela (pri večini), ali pa se bo razvil CIN 2+. Poleg tega je ugotovil, da se je zaradi uporabe testa število napotitev na kolposkopske preglede zmanjšalo za 75 % (25).

Genotipizacija

Do junija 2014 je bilo opredeljeno že skoraj 200 različnih genotipov HPV (26). Klinično najpomembnejši so genotipi HPV iz rodu alfa. Približno 40 od teh lahko okuži ploščatocelični epitel sluznic in jih delimo na genotipe z visokim tveganjem in z nizkim tveganjem (NT). Med HPV-VT prištevamo 12 genotipov, ki so odgovorni za nastanek več kot 99 % primerov RMV (26). Najpomembnejša genotipa sta HPV-VT 16 in 18, ki sta povezana z več kot 70 % RMV (27).

Na svetovnem tržišču je bilo ob koncu leta 2013 vsaj 145 različnih komercialno dostopnih testov HPV in skoraj 90 njihovih različic, vendar jih zelo malo zadostuje minimalnim merilom za varno uporabo v klinične namene (28). Različni testi za HPV-genotipizacijo imajo različne rezultate:

- na svetovnem tržišču najbolj pogosto uporabljen test Hybrid Capture® 2 (hc2) HPV DNA Test (Qiagen) zazna prisotnost 13 HPV-VT, vendar ne loči med različnimi genotipi;
- testi, ki zaznajo HPV-VT in hkrati povedo, ali sta v vzorcu prisotna genotipa HPV-16 in HPV-18. Prednost teh testov je določitev HPV-16 in HPV-18, ki sta najbolj onkogeni izmed HPV, ter s tem določitev žensk z največjimi tveganjem CIN2+ ter možnost manj agresivnega zdravljenja žensk okuženih z ostalimi HPV;
- testi, ki zaznajo posamezne HPV genotipe;
- testi, ki temeljijo bodisi na določevanju virusne mRNA za virusna proteina E6 in E7;

- testi, ki temeljijo na metodi *in-situ* hibridizacije (27, 29).

Večina testov je zelo analitično občutljivih, vendar klinična specifičnost ni zagotovljena. Velika analitična občutljivost testov je dobrodošla pri razvoju cepiv, ni pa primerna za presejanje/triažo HPV-pozitivnih žensk. Pri presejanju/triaži je pomembna klinična specifičnost, saj tako številnim ženskam s klinično nepomembnimi HPV okužbami prihrani mo nepotrebne preglede.

Metilacija DNK

Metilacija DNK je bila v zadnjih letih zelo proučevana molekularna metoda za triažo HPV pozitivnih žensk. Metilacija DNK je normalen pojav, s katerim se uravnava izražanje genov v različnih tkivih, razvoj tkiv v ontogenetskem razvoju itd. Za mnoge oblike raka je opisano, da se spremeni delovanje encimov DNK-metiltransferaze (DNMT). DNMT encimi omogočajo, da se na citozinske baze v DNK pripnejo metilne skupine, ki kondenzirajo kromatin, kar pomeni, da se geni, ki so na tej regiji, ne prepisujejo. Ali je metilacija vzrok ali posledica kancerogeneze ni znano, se pa podre uravnavanje celičnega cikla, če so metilirani tumorski zaviralni geni ali zaviralni elementi protonkogenov.

V strokovni literaturi se že več let opisuje meritev ravni metilacije kot možen označevalec za triažo HPV pozitivnih žensk (30). Meritev metilacije je mogoče izvesti na DNK, izolirani iz različnih (tudi samoodvzetih) vzorcev, kar ima velik pomen pri nadaljnjem razvoju presejalnih programov za RMV (31). Spremembe v metilacijskem statusu HPV pozitivnih žensk naj bi nastale zaradi neposrednega vpliva virusnih proteinov na delovanje DNMT encimov in/ali zaradi sprožene obrambne reakcije okuženih celic, ki s spremenjeno metilacijo virusnih in človeških genov poskušajo nadzorovati izdelovanje proteinov in število celičnih delitev (32).

Za triažo se lahko določa stopnjo metiliranosti človeških genov ali pa HPV genov. Pri slednjih so največkrat opisani testi za merjenje ravni metilacije virusnega genotipa HPV16, katerega okužba vodi v največji delež RMV (33, 34).

Najbolj informativen pristop je verjetno kombinacija meritev ravni metilacije na virusnih in človeških genih. Pred kratkim je bil v literaturi opisan takšen test: analitična občutljivost testa je 90 %, klinična specifičnost za HPV 16, HPV 18 in HPV 31 je: 38 %, 53 % in 44 %. Pri hkratnih okužbah s HPV 16, 18 in 31 je klinična specifičnost 44 % in pri okužbah z drugimi HPV genotipi 17 %. Test je bil preverjen na kolposkopsko

pregledani populaciji, njegova prava vrednost pa se bo pokazala šele pri uporabi v primarnem presejanju (35).

Zaključek

V zadnjih desetletjih je bilo citološko presejanje izjemno pomembno za zmanjšanje incidence RMV. Nova spoznanja na področju naravnega poteka nastanka RMV in nove tehnologije pa predstavljajo nove izzive za presejalne programe in nalagajo državam resen razmislek o primarni preventivi RMV s cepljenjem in morebitni uvedbi HPV testiranja v primarno presejanje. Seveda pa se bomo morali pri tem odločiti, kako obravnavati HPV-VT pozitivne ženske, da jih ne bomo po nepotrebem obremenjevali z dodatnimi preiskavami in nepotrebim zdravljenjem. Na vse te spremembe bo treba misliti tudi pri nadaljnjem razvoju programa ZORA.

Na podlagi izsledkov iz literature lahko potrdimo, da uporaba dodatnih označevalcev znatno pripomore k povečanju občutljivosti in specifičnosti odkrivanja CIN2+ in s tem pripomore k večji kakovosti presejalnega programa. Na ta način se tudi zmanjšajo stroški programa, zmanjša se negotovost žensk, izognemo pa se tudi nepotrebim diagnostičnim in terapevtskim posegom.

Literatura

1. Durst M, Gissmann L, zur Hausen H. A papilloma virus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 12: 3812–5.
2. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shan KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244–65.
3. Muñoz N, Castellsague X, de Gonsales AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl. 3): 1–10.
4. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 2012; Suppl 5: G1–G3.
5. Arbyn M, Roelens J, Simoons C, Buntinx F, Paraskevidis E, Martin-Hirsch PP, et al. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 3: CD008054. Epub 2013/04/02.
6. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5: F88–99. Epub 2012/12/05.
7. Uršič-Vrščaj M, Rakar S, Možina A, Kobal B, Takač I, Deisinger D, et al. Smernice za celostno obravnavo žensk s predrakavimi spremembami materničnega vratu. *Posodobitev* 2011. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, 2011.

8. Učakar V, Poljak M, Klavs I. Pre-vaccination prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) types in Slovenian women: a cervical cancer screening based study. *Vaccine* 2012; 30(2): 116–20. Epub 2011/11/15.
9. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, Lorey T, Poitras NE, Cheung L, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *The Lancet oncology* 2011; 12(7): 663–72. Epub 2011/06/21.
10. Cuzick J, Bergeron C, von Knebel Doeberitz M, Gravitt P, Jeronimo J, Lorincz AT, et al. New technologies and procedures for cervical cancer screening. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5: F107–16. Epub 2012/12/05.
11. Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, Coupe VMH, Hesselink AT, Rozendaal L, et al. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population based cervical screening. *Int J Cancer* 2012; 130: 602–10.
12. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* 2007; 23: 315–30.
13. Van Niekerk DV, Guillaud M, Matisic J, Benedet JL, Freeberg JA, Follen M, et al. P16 and MIB1 improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of high grade squamous intraepithelial lesions: Methodological issues in a report of 447 biopsies with consensus diagnosis and HPV HC II testing. *Gynecol Oncol* 2007; 107: 233–40.
14. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detections as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 2536–45.
15. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. p16 immunostaining in cytological in histological specimen from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Rev* 2009; 35: 21
16. Al-Saleh W, Delvenn P, Greimers R, Fridman V, Doyen J, Boniver J. Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Correlation with the histologic grade and human papilloma virus type. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 154–60.
17. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16^{INK4A} as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92: 276–84.
18. Strojjan Fležar M, Gutnik H. Biološka označevalca p16 in Ki-67 za opredelitev cervikalne intraepiteljske neoplazije v biopsijskih vzorcih materničnega vratu. *Onkologija* 2012;1: 40–3.
19. Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 257: 231–7.
20. Pinto AP, Crum CP, Hirsch MS. Molecular markers of early cancer neoplasia. *Dign Histopathol (Oxf)* 2010; 16: 445–54.
21. Brown CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, Malinowski DP. Role of protein biomarkers in the detection of high grade disease in cervical cancer screening programs. *J Oncol* 2012; 2012 Article ID 289315. doi: 10.1155/2012/289315:1–11.
22. Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma M et al. Use of p16^{INK4a} overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested study of the NTCC randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2008; 9: 937–45.
23. Roelens J, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. p16^{INK4a} immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage women with minor cytological abnormalities. A systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathology* 2012; 120: 294–307.
24. Edgerton N, Cohen C, Siddiqui MT. Evaluation of CINtec PLUS[®] testing as an adjunctive test in ASC-US diagnosed Surepath[®] preparations. *Diagnostic cytopathology* 2011; 41: 35–40.
25. Petry U, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, Kommos F, Löning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R. Triage Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki67 dual-stained cytology. *Gynecology Oncology* 2011; 121: 505–9.
26. IARC. Human papillomaviruses. In: *A Review of Human Carcinogens: Biological Agents*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 100B. Lyon: IARC; 2012: 255–313.
27. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J, Arbyn M. Nucleic Acid Tests for the Detection of Alpha Human Papillomaviruses. *Vaccine* 2012; Supplement 30: F100–F106.
28. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 2011; 128, 927–35.
29. Cubie HA, Cuschieri K. Understanding HPV tests and their appropriate applications. *Cytopathology* 2013; 24, 289–308.
30. Wentzensen N, Sherman ME, Schiffman M, Wang SS. Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: Appraisal of the state-of-the-science. *Gynecol. Oncol.* 2009; 112, 293–99.
31. Hesselink AT, et al. Methylation marker analysis of self-sampled cervico-vaginal lavage specimens to triage high-risk HPV-positive women for colposcopy. *Int J Cancer* 2014; 135, 880–6.
32. Johannsen E, Lambert PF. Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology* 2013; 445, 205–12.
33. Mirabello L, Schiffman M, Ghosh A, Rodriguez AC, Vasiljević N, Wentzensen N, et al. Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* 2013; 132, 1412–22.
34. Lorincz AT, Brentnall AR, Vasiljević N, Scibior-Bentkowska D, Castanon A, Fiander A, et al. HPV16 L1 and L2 DNA methylation predicts high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with mildly abnormal cervical cytology. *Int J Cancer* 2013; 133, 637–44.
35. Brentnall AR, Vasiljević N, Scibior-Bentkowska D, Cadman L, Austin J, Szarewski A, et al. A DNA methylation classifier of cervical precancer based on human papillomavirus and human genes. *Int J Cancer* 2014; 135, 1425–32.