

## Presejanje s testom HPV: kateri testi izpolnjujejo merila za uporabo v presejalnih programih

Mario Poljak, Anja Oštrbenk

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

### Povzetek

HPV-testiranje se po mednarodno sprejetih smernicah uporablja za tri ključne klinične indikacije: (i) kot triažni test za nadaljnjo obravnavo žensk z mejnim citološkim izvidom; (ii) za kontrolo uspešnosti zdravljenja cervikalnih intraepitelijskih neoplazij visoke stopnje (CIN 2+); (iii) v primarnem presejalnem testiranju za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu. Avgusta 2015 je bilo na svetovnem tržišču vsaj 193 različnih komercialno dostopnih testov HPV in vsaj 127 njihovih različic. Kljub tako velikemu številu le zelo omejen nabor testov HPV na tržišču (manj kot desetina) izpolnjuje minimalne kriterije za varno uporabo v klinične namene za vsaj eno od dogovorjenih kliničnih indikacij. Izmed vseh razpoložljivih testov HPV jih trenutno samo 13 izpolnjuje kriterije za varno uporabo v primarnih presejalnih programih. Testov HPV, ki niso bili ustrezno klinično preverjeni, v klinični praksi ne smemo uporabljati. V prihodnosti bi se morali proizvajalci testov namesto na izdelavo popolnoma novih testov HPV osredotočiti predvsem na klinične validacije že obstoječih testov HPV in nadaljnje izboljšave, s katerimi bi dosegli optimalno ravnovesje med klinično občutljivostjo in klinično specifičnostjo.

**Ključne besede:** človeški papilomavirusi, HPV, HPV testiranje, presejalni programi, HPV primarno presejanje

### Osnovni koncept diagnostike okužbe s HPV

HPV dokazujemo izključno z molekularnimi metodami. Okužbo s HPV je sicer mogoče dokazati tudi z opazovanjem značilnih citopatskih sprememb epitelnih celic s svetlobnim mikroskopom, z opazovanjem virusnih delcev s pomočjo elektronskega mikroskopa ali z dokazovanjem virusnih strukturnih beljakovin z imunohistokemičnimi metodami, vendar se zaradi nizke občutljivosti in nezmožnosti določanja genotipa HPV te metode ne uporabljajo v rutinski diagnostiki okužb s HPV (1, 2). V nadaljevanju bomo na kratko predstavili osnovni koncept HPV testiranja v primerjavi z drugimi mikrobiološkimi testi, ki jih uporabljamo v medicini.

HPV-testiranje se po mednarodno sprejetih smernicah uporablja za tri ključne klinične indikacije:

- kot triažni test za nadaljnjo obravnavo žensk z mejnim citološkim izvidom npr. ASC-US (angl. *atypical squamous cells of undetermined significance*) ali LSIL (angl. *low grade squamous intraepithelial lesion*);
- za kontrolo uspešnosti zdravljenja cervikalnih intraepitelijskih neoplazij visoke stopnje (CIN 2+);
- kot primarno presejalno testiranje za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu (3).

Trenutno se HPV-testiranje v številnih državah, vključno s Slovenijo, rutinsko uporablja za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za raka materničnega vratu. V Sloveniji se HPV testiranje rutinsko uporablja kot triažni test od leta 2011 kot pomoč pri odločitvi, ali ženska potrebuje kolposkopski pregled ali ne. Trenutne indikacije za uporabo triažnega testa HPV pri ženskah v Sloveniji so:

- atipične ploščate celice, neopredeljene (APC-N);
- ploščatocelična intraepitelijska neoplazija nizke stopnje (PIL-NS) pri ženskah, starih 35 let ali več;
- atipične žlezne celice, neopredeljene (AŽC-N);
- spremljanje žensk s CIN 1;
- CIN - po zdravljenju.

Klinični pomen izvida testa HPV v kolposkopski ambulanti, indikacije za uporabo testa HPV v Sloveniji ter problemi, povezani z nekritično uporabo ali neuporabo testa HPV, so podrobno opisani v prispevku Ivanuš U. in Primic Žakelj M. z naslovom »Pomen izvida testa HPV v kolposkopski ambulanti«, objavljenem v Zborniku kolposkopskega tečaja 2013 (4).

V preteklih letih je bilo objavljenih več raziskav, ki so dokazale učinkovitost HPV-testiranja v okviru primarnega presejalnega programa za raka ma-

terničnega vratu (5–8). Na vzorcu več kot milijon žensk, starih od 30 do 64 let, je bilo dokazano, da je kumulativno tveganje za CIN2+, CIN3+ in rak materničnega vratu (RMV) statistično značilno manjše v vseh skupinah v primarnem presejalnju s HPV-testiranjem v primerjavi s presejanjem s citologijo. Dodatno so raziskave pokazale, da ni statistično pomembnih razlik med presejanjem samo s testom HPV in hkratnim presejanjem s citologijo in testom HPV. Velike, klinično randomizirane raziskave so dokazale, da primarno HPV-testiranje nudi 60–70 % večjo varnost pred invazivnim RMV v primerjavi s primarnim presejanjem s citologijo (5–8). Tako so leta 2015 izšle dopolnitve Evropskih smernic za zagotavljanje kakovosti v presejanju za raka materničnega vratu iz leta 2008, v katerih se priporoča primarno testiranje s testom HPV za ženske, ki so starejše od 35 let. Pri ženskah, mlajših od 30 let, se presejanje s testom HPV odsvetuje. Ne glede na starost žensk se odsvetuje tudi hkratna uporaba obeh presejalnih testov (hkratno presejanje) (9). V naslednjih nekaj letih tudi v Sloveniji pričakujemo pomembne spremembe presejalne sheme, kot to priporočajo Evropske smernice iz leta 2015, ki temeljijo na novih spoznanjih in razvoju tehnologije na področju HPV-testov in vstopu proti-HPV cepljenih generacij v presejalni program.

### Testi HPV na svetovnem tržišču

Smernice, ki narekujejo uporabo testov HPV, temeljijo izključno na uporabi klinično preverjenih testov. Po podatkih zadnjega preglednega članka je bilo na svetovnem tržišču avgusta 2015 vsaj 193 različnih komercialno dostopnih testov HPV in vsaj 127 njihovih različic. Kljub tako velikem številu le zelo omejen nabor testov HPV na tržišču (manj kot desetina) izpolnjuje minimalne kriterije za varno uporabo v klinične namene za vsaj eno od dogovorjenih kliničnih indikacij. Poleg tega več kot tri četrtine testov HPV, ki so trenutno komercialno dostopni, nima niti ene same objave v recenziranih znanstvenih revijah. Enotni zaključek vseh strokovnjakov je, da tako komercialno dostopnih testov HPV kot tistih razvitih v laboratoriju (angl. *in-house tests*), ki niso bili ustrezno klinično preverjeni, ne smemo uporabljati v klinični praksi. Zaradi pomanjkanja predpisov in šibke kontrole na tem področju se na žalost po vsem svetu (razen v ZDA) v vsakdanji praksi uporabljajo številni testi HPV, ki niso klinično preverjeni. To se na srečo v Sloveniji zaenkrat ne dogaja in močno upamo, da bo tako ostalo tudi v prihodnje (10, 11).

HPV-testiranje za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za raka materničnega vratu se bistveno razlikuje od molekularnega testiranja na druge medicinsko pomembne viruse, ker visoka

analitična občutljivost testa ni glavni kriterij za njegovo dobro klinično uporabnost. Kljub temu dejstvu ima več kot tri četrtine komercialno dostopnih testov HPV, ki se trenutno uporabljajo po svetu, previsoko analitično občutljivost, ki vodi v prekomerno odkrivanje prehodnih, klinično nemih in produktivnih okužb s HPV, s čimer narašča število nepotrebnih kolposkopij in biopsij, slabo korelacijo testa HPV s histologijo, nepotrebno zdravljenje in posledično vodi v zdravnikovo nezaupanje pozitivnim rezultatom testa HPV (10, 11).

Druga posebnost testov HPV v primerjavi z drugimi mikrobiološkimi testi, je ta, da je za boljše prepoznavanje žensk z večjim tveganjem za raka materničnega vratu potrebno uravnovesiti število tarčnih genotipov HPV v testu. Tako je pri načrtovanju novega testa HPV, ki naj bi se uporabljal za dogovorjene klinične indikacije, potrebno zelo dobro pretehtati, kako uskladiti klinično občutljivost s klinično specifičnostjo za odkrivanje predrakavih sprememb. Z vključitvijo HPV genotipov, ki so pogosti pri nemih okužbah ali predrakavih spremembah nizke stopnje in le redko ali izjemoma povezani z rakom materničnega vratu (npr. HPV-53 ali HPV-66), tvegamo zelo velik padec klinične specifičnosti testa HPV ob zanemarljivi izboljšavi klinične občutljivosti. Prav tako je potrebno imeti v mislih, da ne glede na najvišjo možno analitično občutljivost testa HPV, s katerim izvedemo primarno presejalno HPV-testiranje na raka materničnega vratu, negativni izvid ni nikoli popolno zagotovilo za odsotnost bolezni zaradi mnogih drugih, od testa HPV neodvisnih, dejavnikov, npr. nekvalitetno odvzet bris, za bris nedostopna sprememba, zamenjan vzorec, neprimeren transport vzorca, prisotnost bioloških in nebioloških zaviralcev v vzorcu, napaka izvajalca testiranja, zamenjava izvida, neprimerno razumevanje rezultata testa (10, 11). Najpomembnejša parametra, ki opredeljujeta namen uporabe testa HPV, sta torej nabor tarčnih genotipov HPV, ki so vključeni v test, in njegova analitična občutljivost. Glede na to lahko teste HPV razdelimo v tri glavne kategorije: (i) testi HPV, ki jih uporabljamo v klinični praksi, (ii) testi HPV, ki jih uporabljamo v epidemioloških raziskavah in raziskavah, ki so povezane s cepljenjem, in (iii) testi HPV za različne raziskovalne namene. V nadaljevanju bomo predstavili le prvo skupino testov HPV, značilnosti preostalih dveh skupin testov HPV so podrobno opisane v nedavno objavljenem preglednem članku (11).

### Testi HPV, ki izpolnjujejo kriterije za uporabo v klinični praksi

Podobno kot drugi mikrobiološki testi, ki jih uporabljamo v medicini, mora vsak nov test 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 HPV, so leta 2009 objavili mednarodna strokovna priporočila o tem, kako ustrezno ovrednotiti novo razvite teste HPV predvsem za varno uporabo v primarnem presejalnem testiranju za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu ter za druge klinične indikacije (10, 11). Mednarodna priporočila (t. i. smernice po Meijer-ju) temeljijo na tem, da morajo testi HPV izpolnjevati vse dogovorjene standarde za klinično občutljivost, klinično specifičnost in znotraj- in med- laboratorijsko ponovljivost (12), medtem ko se lahko razlikujejo glede na tehnologijo testiranja, stopnjo avtomatizacije, materialne stroške testiranja in sposobnost analize različno velikega števila vzorcev. Testi HPV, ki so bili do aprila 2017 klinično validirani za uporabo v primarnem presejalnem testiranju za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu po trenutno veljavnih mednarodnih smernicah, so: (I) Hybrid Capture 2 assay (hc2, Qiagen Inc., Gaithersburg, MD, ZDA), (II) EIA kit HPV GP GP5+/6+

HR, (III) cobas 4800 PCR (Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, ZDA), (IV) APTIMA (Hologic, Madison, WI, ZDA), (V) Cervista HPV HR Test (Hologic, Madison, WI, ZDA), (VI) RealTime High Risk HPV (RealTime, Abbott Molecular, Des Plaines, IL, ZDA), (VII) PapilloCheck HPV-screening test (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemčija), (VIII) Real-time quantitative PCR (qPCR) assay targeting the E6 and E7 genes (test se uporablja le v enem laboratoriju v Belgiji), (IX) HPV-Risk assay (Self-Screen BV, Amsterdam, Nizozemska), (X) BD Onclarity HPV assay (BD Diagnostics, Sparks, MD, ZDA), (XI) LMNX Genotyping kit GP HR (Diassay, Ev Rijswijk, Nizozemska), (XII) Anyplex II HPV HR (Seegene, Seoul, Koreja) in (XIII) Xpert HPV (Cepheid, Sunnyvale, CA, ZDA) (13). Vsi navedeni testi so podrobneje predstavljeni v Tabeli 1. Med zgoraj omenjenimi testi so le za pet testov: hc2, GP5+/6+ PCR, cobas 4800 PCR, RealTime High Risk HPV in APTIMA v raziskavah z vsaj 3-letnim sledenjem dokazali, da HPV negativen rezultat testa zagotavlja večjo varnost kot negativen citološki rezultat v primarnem presejanju za RMV (13).

**Tabela 1.** Povzetek testov HPV, ki izpolnjujejo merila za uporabo v presejalnih programih za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu. Hr-HPV=bolj nevarni HPV. PCR=verižna reakcija s polimerazo.

Test HPV (proizvajalec)	Tehnologija	Tarčno genomsko področje HPV	Tarčni genotipi
Hybrid Capture II (Qiagen)	hibridizacija	/	13 hrHPV (opcijsko delna genotipizacija za HPV16/HPV18/HPV45)
EIA kit HPV GP GP5+/6+ HR	PCR in hibridizacija	L1	14 hrHPV
Cobas 4800 HPV Test (Roche)	PCR v realnem času	L1	14 hrHPV (delna genotipizacija za HPV16 in HPV18)
APTIMA (Gen-Probe, Hologic)	PCR z reverzno transkripcijo in hibridizacija	E6/E7 mRNA	14 hrHPV (opcijsko delna genotipizacija za HPV16 in HPV18/45)
Cervista HPV HR Test (Hologic)	PCR v realnem času	E6/E7	14 hrHPV (opcijsko delna genotipizacija za HPV16 in HPV 18)
RealTime High Risk HPV Test (Abbott Molecular)	PCR v realnem času	L1	14 hrHPV (delna genotipizacija za HPV16 in HPV18)
PapilloCheck HPV-screening Test (Greiner Bio-One)	PCR in hibridizacija	E1	24 HPV genotipov (kompletna genotipizacija)
Real-time quantitative PCR assay (qPCR)	Kvantitativni PCR v realnem času	E6/E7	14 hrHPV (+ HPV6, HPV53, HPV67)
HPV-Risk assay (Self-Screen BV)	PCR v realnem času	E7	14 hrHPV (+HPV67)
BD Onclarity HPV Assay (BD Biosciences)	PCR v realnem času	E6/E7	14 hrHPV (delna genotipizacija za HPV16, HPV18, HPV45, HPV33/58, HPV31, HPV56/59/66, HPV51, HPV52, HPV35/39/68)
LMNX Genotyping kit GP HR (Diassay)	PCR in hibridizacija	L1	14 hrHPV (kompletna genotipizacija)
Anyplex II HPV HR Test (Seegene)	PCR v realnem času	L1	14 hrHPV (kompletna genotipizacija)
Xpert HPV (Cepheid)	PCR v realnem času	E6/E7	14 hrHPV (delna genotipizacija HPV16 in HPV18/45)

Poleg smernic po Meijer-ju obstajata še dva večja akademska projekta, ki sta klinično ovrednotila različne teste HPV za varno uporabo v primarnem presejalnem testiranju za zgodnje odkrivanje raka materničnega vratu: VALGENT in PREDICTORS-3 (14, 15). VALGENT (*angl. clinical VALIDation of human papillomavirus GENotyping Tests*) je akademska iniciativa, ki omogoča preverjanje in primerjavo večjega števila testov HPV na arhivskih vzorcih brisov materničnega vratu. VALGENT-1 in VALGENT-2, ki sta potekala na belgijskih in škotskih vzorcih, sta že zaključena, medtem ko VALGENT-3 na slovenskih vzorcih in VALGENT-4 na danskih vzorcih še poteka (14).

### Prihodnost HPV-testiranja

V prihodnosti bi se morali proizvajalci testov namesto na izdelavo popolnoma novih testov HPV osredotočiti predvsem na klinične validacije in nadaljnje izboljšave že obstoječih testov HPV. Glavni cilji za nadaljnje izboljšave testov HPV so avtomatizacija, boljša klinična občutljivost in višja klinična specifičnost. Idealni test HPV naj bi imel optimalno ravnovesje med klinično občutljivostjo in klinično specifičnostjo, s katerim bi odkrili skoraj vse ženske s hudimi predrakavimi spremembami materničnega vratu oz. rakom in čim manj žensk, ki imajo le prehodno okužbo s HPV in ne potrebujejo zdravljenja ali pogostega sledenja. Temeljne raziskave razumevanja mehanizmov patogeneze napredovanja predrakavih sprememb do raka materničnega vratu tako ostajajo prednostna naloga, saj bi lahko rezultati takšnih raziskav privedli do odkritja novih bioloških označevalcev za CIN3/rak materničnega vratu, ki bi jih lahko uporabili kot nove diagnostične tarče v presejalnih oz. triažnih testih (10, 11).

### Literatura

- Kocjan BJ, Poljak M. Papilomavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p.41-60.
- Poljak M, Kocjan BJ, Seme K, Fujs K, Potočnik M, Luzar B. Humani virusi papiloma (HPV). *Onkologija*. 2005;2:60-72.
- Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *J Clin Virol*. 2009;45(Suppl. 1):S3-12.
- Ivanuš U, Primic Žakelj M. Pomen izvida testa HPV v kolposkopski ambulanti. In: Smrkolj Š, ed. Obnovitveni kolposkopski tečaj (zbornik); 2013 Mar 29-30; Ljubljana (Slovenia). Ljubljana: Združenje za ginekološko onkologijo, kolposkopijo in cervikalno patologijo SZD in Onkološki inštitut; 2013. p. 78-101.
- Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014;383(9916):524-32.
- Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, et al. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *Br Med J*. 2008;337:a1754.
- Gage JC, Schiffman M, Katki HA, Castle PE, Fetterman B, Wentzensen N, et al. Reassurance against future risk of precancer and cancer conferred by a negative human papillomavirus test. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(8):dju153.
- Dillner J. Primary human papillomavirus testing in organized cervical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2013;25:11-6.
- von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Research*. 2015;doi:10.1016/j.pvr.2015.06.006.
- Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, et al. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;Suppl 30:F100-6.
- Poljak M, Kocjan BJ, Oštrbenk A, Seme K. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. *J Clin Virol*. 2016;76 Suppl 1:S3-13.
- 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.
- Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, et al. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(9):817-26.
- 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.
- Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer*. 2013;108(4):908-13.