



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΗ ΕΠΑΦΗ, ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΗΡV,
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΓΙΑ C1N»**

**ΒΑΛΑΣΟΥΛΗΣ Δ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΗ ΕΠΑΦΗ, ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΗΡV,
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΓΙΑ C1N»**

**ΒΑΛΑΣΟΥΛΗΣ Δ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202,
παράγραφος 2
(νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Βαλασούλη Γεώργιου: 16-4-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 640^α/17-6-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Παρασκευαΐδης Ευάγγελος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Στέφος Θεόδωρος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ναυρόζογλου Ιορδάνης Λέκτορας Μαιευτικής –Γυναικολογίας με ειδικές γνώσεις Γυναικολογικής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 9-7-2008

«Η επίδραση της συστηματικής χρήσης προφυλακτικού κατά την σεξουαλική επαφή, στη δραστηριότητα του ιού HPV μετά από συντηρητική θεραπεία για CIN»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 764^α/17-6-2014

Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καρακίτσος Πέτρος	Καθηγητής Κυτταρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Λουφόπουλος Αριστοτέλης	Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Παρασκευαΐδης Ευάγγελος	Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πασχόπουλος Μηνάς	Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στέφος Θεόδωρος	Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ναυρόζογλου Ιορδάνης	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία και Παθολογία του Μαστού, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 18-6-2014

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Ανδρέας Φωτόπουλος

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στους μοναδικούς «συνένοχους» χρόνου και ψυχής...

...στην οικογένειά μου

"The lion cannot protect himself from traps, and the fox cannot defend himself from wolves. One must therefore be a fox to recognize traps, and a lion to frighten wolves"

"It is not titles that honour men, but men that honour titles"

Niccolò Machiavelli

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο πληθυσμιακός έλεγχος βασιζόμενος στη χρήση της κυτταρολογίας, στοχεύει στην πρώιμη ανίχνευση και θεραπεία των προδιηθητικών τραχηλικών αλλοιώσεων και συνεπώς στη μείωση της επίπτωσης και της θνησιμότητας από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οργανωμένα προγράμματα πληθυσμιακού ελέγχου, με υψηλό ποσοστό συμμόρφωσης του πληθυσμού, και ικανοποιητική θεραπευτική διαχείριση των γυναικών με ανιχνευόμενες τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, έχουν οδηγήσει σε μείωση της επίπτωσης του διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε ποσοστό έως και 80%.

Βασιζόμενοι σε δεδομένα από τη Μ. Βρετανία, υπολογίζεται ότι περίπου το 10% του γενικού πληθυσμού που ελέγχεται στο πλαίσιο της δευτερογενούς πρόληψης για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, θα εμφανίσει παθολογική κυτταρολογία, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό αυτού, θα οδηγηθεί σε θεραπευτική αντιμετώπιση των ανιχνευόμενων αλλοιώσεων.

Οι διαθέσιμες συντηρητικές μέθοδοι θεραπείας (καταστροφικές-αφαιρετικές) έχουν παρόμοια υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας σε ποσοστό που αγγίζει το 90%. Παρά το γεγονός αυτό, ένα ποσοστό (5-10%) των γυναικών θα οδηγηθεί σε επαναληπτική θεραπεία για υπολειπόμενη ή υποτροπιάζουσα νόσο. Επιπρόσθετα, οι γυναίκες αυτές, οι οποίες έχουν υποβληθεί σε θεραπεία, διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης μελλοντικής διηθητικής νόσου (4-5 φορές) σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Αποτελεί κοινή παραδοχή, σύμφωνα με τις υπάρχουσες μελέτες, ότι δεν υπάρχει τεχνική η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε οριστική εκρίζωση της νόσου.

Στο πλαίσιο αυτό, η έρευνα έχει επικεντρωθεί τόσο στην πρόληψη της HPV λοίμωξης (πρωτογενής-HPV εμβόλια), όσο και στην έγκαιρη ανίχνευση πιθανής εξέλιξης της νόσου, με έμφαση στη διαχείριση της ομάδας των γυναικών που χρήζουν θεραπείας και έχουν υποβληθεί σε θεραπεία για τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις.

Η ευεργετική επίδραση της χρήσης του προφυλακτικού στην πρόληψη των HPV λοιμώξεων και τραχηλικών ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, έχει ήδη αποδειχθεί σε προγενέστερες μελέτες. Από τις μελέτες αυτές, προκύπτει ότι η συστηματική χρήση προφυλακτικού στο γενικό πληθυσμό επάγει όχι μόνο την προστασία από τη

μετάδοση των γενετικών κονδυλωμάτων αλλά μπορεί να επιβραδύνει την εξέλιξη προκαρκινικής αλλοίωσης σε διηθητική νόσο και να οδηγήσει στην υποστρόφη των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων.

Μια ερευνητική προσπάθεια κάλυψης του υπάρχοντος επιστημονικού κενού όσον αφορά την επίδραση της συστηματικής χρήσης του προφυλακτικού μετά από θεραπεία για ενδοεπιθηλιακές προκαρκινικές αλλοιώσεις, αποτελεί η παρούσα τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη, στο ευρύτερο πλαίσιο ανάπτυξης ενός εξατομικευμένου συστήματος αξιολόγησης αθροιστικού κινδύνου στη διαχείριση γυναικών με παθολογικό κυτταρολογικό επίχρισμα.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ευάγγελου Παρασκευαΐδη, ο οποίος υπήρξε όχι μόνο ο εμπνευστής του αντικειμένου της εν λόγω μελέτης, αλλά και ο κύριος συμβαλλόμενος κατά την εκπόνησή της και τη συγκέντρωση του υπό μελέτη υλικού. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη στον υποφαινόμενο, και το ιδιαίτερο ενδιαφέρον και την απαιτούμενη συμπαράσταση που έδειξε σε όλα τα στάδια πραγμάτωσής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Θεόδωρο Στέφο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιορδάνη Ναυρόζογλου, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη σημαντική επιστημονική βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια εκπόνησής της.

Ευχαριστίες αρμόζουν επίσης στους κυρίους Γεώργιο Κολιόπουλο Μαιευτήρα-Γυναικολόγο και Marc Arbyn Επιδημιολόγο από τις Βρυξέλλες, για τη καθοριστική συμβολή τους στον άρτιο επιστημονικά σχεδιασμό και τις αναλύσεις των δεδομένων της παρούσας μελέτης. Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες αξίζει να αποδοθούν στον Καθηγητή Κυτταρολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κύριο Πέτρο Καρακίτσο, για την ουσιαστική βοήθειά του στη κυτταρολογική και μοριακή ανάλυση των λαμβανόμενων δειγμάτων, καθώς επίσης και στην ανάπτυξη και διαχείριση του προγράμματος της βάσης δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη.

Γεώργιος Δ. Βαλασούλης
Ιωάννινα, Ιούνιος 2014

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	5
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	7
Ο ΙΟΣ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ-ΚΟΝΔΥΛΩΜΑΤΩΝ (Human Papillomavirus).....	9
ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΗΡV ΛΟΙΜΩΣΗΣ	13
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ	17
Ο ρόλος του p16 ^{INK4A} στην καρκινογένεση	20
Επιγενετικά φαινόμενα	21
ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΑΖΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	25
Συμβατική Κυτταρολογία	25
Κυτταρολογία Υγρής Φάσης (Liquid Based Cytology)	27
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΗΡV	29
Τεχνικές βασισμένες σε Υβριδισμό	30
Τεχνικές βασισμένες στην ενίσχυση Νουκλεϊκών Οξέων	33
Τεχνικές βασιζόμενες στον συνδυασμό της PCR με Υβριδισμό	37
ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ	43
ΕΙΔΗ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ	45
Άτυπα κύτταρα του πλακώδους επιθηλίου αδιευκρίνιστης σημασίας - Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASCUS)	45
Χαμηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις - Low grade Squamous Intraepithelial Lesions (LgSIL)	46
Υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις - High grade Squamous Intraepithelial Lesions (HgSIL)	47
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	49
ΗΡV ΕΜΒΟΛΙΑ.....	53
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ.....	57
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ CIN.....	61
ΜΕΘΟΔΟΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ	63
Α. Κωνοειδής εκτομή με νυστέρι (Knife cone biopsy - Cold Knife Conization)	64
Β. Laser κωνοειδής εκτομή (Laser conisation)	64
Γ. Ευρεία κωνοειδής εκτομή της ζώνης μετάπτωσης με την αγκύλη διαθερμίας (LLETZ / LEEP).....	65
Δ. Εξάχνωση με χρήση Laser (Laser ablation)	65
Ε. Κρυοθεραπεία	66

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΗΡV.....	67
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	71
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	73
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	75
α. Κριτήρια εισαγωγής	75
β. Κριτήρια αποκλεισμού	75
γ. Μεθοδολογία	76
δ. Στατιστική Ανάλυση	81
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	83
ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	83
INTENTION TO TREAT ΚΑΙ PER PROCOCOL ΑΝΑΛΥΣΗ	87
ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΠΟΟΜΑΔΩΝ - MULTIPLE OUTCOMES AND SUBGROUP ANALYSES.....	101
ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΤΗΤΑΣ ΗΡV-ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΑΠΟΤΥΧΙΕΣ	109
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	117
ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	125
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	127
SUMMARY	129
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	133

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μία από τις πιο συχνές κακοήθειες νόσους στις γυναίκες παγκοσμίως. Κάθε χρόνο με βάση δεδομένα του 2008, διαγιγνώσκονται 530.000 νέα περιστατικά και καταγράφονται 275.000 θάνατοι σε όλο τον κόσμο, με το 86% των περιστατικών να αφορούν αναπτυσσόμενες χώρες (1, 2). Μελέτες στη βιβλιογραφία, δείχνουν πως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας συνιστά τον τρίτο σε συχνότητα καρκίνο μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως στις αναπτυγμένες χώρες, ενώ στις αναπτυσσόμενες το δεύτερο σε συχνότητα καρκίνο για τις ηλικίες από 15 έως 44 ετών (3-5).

Ο κίνδυνος που διατρέχει μία γυναίκα για ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έως την ηλικία των 65 ετών, κυμαίνεται μεταξύ 0.8% στις αναπτυγμένες χώρες και 1.5% στις αναπτυσσόμενες χώρες (6, 7). Στην Ευρώπη, από τα υπάρχοντα έως τώρα δεδομένα, φαίνεται ότι το 60% περίπου των γυναικών με διηθητικό καρκίνο τραχήλου της μήτρας έχει επιβιώσει κατά μέσο όρο 5 χρόνια μετά τη διάγνωση (8).

Η λοίμωξη από τον ιό των Ανθρωπίνων Κονδυλωμάτων (Human Papillomavirus-HPV) αποτελεί βασικό αιτιοπαθογενετικό παράγοντα στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας και αυτό διότι, όπως έχει τεκμηριωθεί πέρα από κάθε αμφιβολία, η HPV λοίμωξη πληροί όλα τα κριτήρια του Zur Hausen, για το χαρακτηρισμό ενός ιού ως ογκογόνου. Εξ αιτίας αυτού, η μόλυνση από συγκεκριμένους ογκογόνους τύπους του ιού (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 και 82), θεωρείται αναγκαία και ικανή συνθήκη για την καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας (9, 10).

Παρά το γεγονός ότι η συχνότητα της HPV λοίμωξης είναι σταθερή σε όλο το κόσμο, με επίπτωση της μόλυνσης μεταξύ νεαρών γυναικών στις βιομηχανικά αναπτυγμένες χώρες της τάξεως του 40-80%, και πιθανότητα προσβολής από τον ιό στη διάρκεια της ζωής κάθε γυναίκας σε ποσοστό 80-90%, η επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας δεν φαίνεται να είναι η ίδια παγκοσμίως. Σε αυτό φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η καθιέρωση οργανωμένων προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου (2, 11).

Βασιζόμενοι στα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν όλους τους τύπους του HPV, 15 υπότυποι αυτού έχουν χαρακτηριστεί σαν υψηλού κινδύνου (High Risk HPV types - HR-HPV) και 12 υπότυποι σαν χαμηλού κινδύνου (Low Risk-HPV types - LR-HPV) στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Μεταξύ των HR-HPV, οι τύποι 16 και 18 ευθύνονται αθροιστικά για το 70% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας (12).

Σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, υπάρχει άμεση επιδημιολογική συσχέτιση του καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας με τους λεγόμενους ογκογόνους τύπους του HPV, ενώ τέσσερις από αυτούς (16, 18, 45, 31) ανιχνεύονται στο 75% περίπου των διηθητικών καρκινωμάτων (13, 14). Με εξαίρεση την Ασία, η επίπτωση του HPV σε ολόκληρο τον κόσμο φαίνεται να είναι αρκετά υψηλή, έως 30% μεταξύ νεαρών γυναικών (15).

Τα δεδομένα αποδίδουν το φαινόμενο αυτό στην αλλαγή της σεξουαλικής συμπεριφοράς στην ηλικιακή ομάδα έως 25 ετών, και στην πρωιμότερη έναρξη των σεξουαλικών επαφών στον πληθυσμό αυτό (16-18). Στις ενδιάμεσες ηλικιακές ομάδες παρατηρείται ύφεση, με τάση αύξησης ξανά στις ηλικιακές ομάδες 35 έως 44 και 45 έως 54 ετών. Σύμφωνα με τις υπάρχουσες μελέτες στη βιβλιογραφία, το δεύτερο κύμα αύξησης εξηγείται από μια ποικιλία συμβαμάτων όπως: α) η σύστοιχη αύξηση τύπων χαμηλού κινδύνου του ιού, β) αλλαγές στη σεξουαλική συμπεριφορά των γυναικών αυτών ή ακόμη και των συντρόφων τους, γ) από αναζωπύρωση λανθανουσών λοιμώξεων λόγω πτώσης του ανοσοποιητικού συστήματος σ' αυτό το ηλικιακό φάσμα και δ) από την εμφάνιση αθροιστικών φαινομένων από τη συνεχιζόμενη έκθεση στον ιό HPV (15, 18-22). Επιπρόσθετα, η εμμονή του ιού φαίνεται να αποτελεί ισχυρότερο αιτιοπαθογενετικό παράγοντα από τη λοίμωξη με νέους τύπους του ιού HPV στη διεργασία της καρκινογένεσης (23).

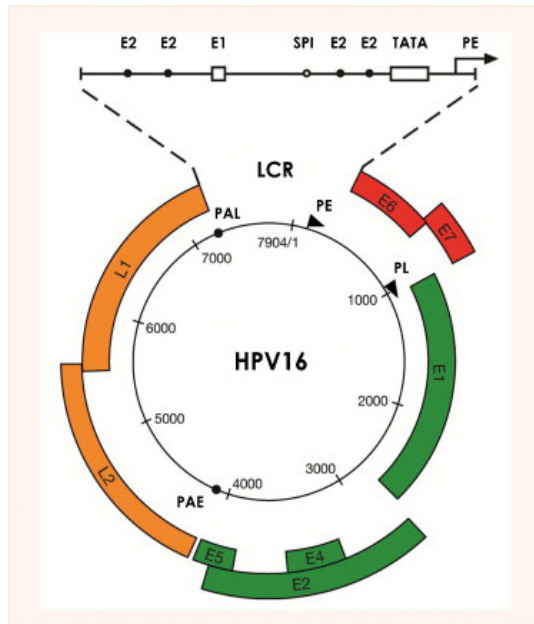
Ο ΙΟΣ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ-ΚΟΝΔΥΛΩΜΑΤΩΝ (Human Papillomavirus)

Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων ανήκει στην οικογένεια Papovaviridae. Αποτελείται από ισο-εδρικά σωματίδια με διάμετρο 55 nm, χωρίς κάψα, που προσβάλλουν επιθηλιακούς ιστούς. Τα καψομερίδια αποτελούνται από δύο δομικές πρωτεΐνες: α) την πρωτεΐνη L1 (57 kDa) σε ποσοστό 80%, με αυξημένη ειδικότητα πάνω σε συγκεκριμένα αντιγόνα και β) την καψιδιακή πρωτεΐνη L2 (43–53 kDa). Η απουσία κάψας προσδίδει στον ιό σχετική σταθερότητα και τη δυνατότητα να αντιστέκεται σε οργανικά διαλύματα.

Ανάμεσα στους διάφορους υπότυπους του HPV παρατηρείται αξιοσημείωτη ετερογένεια. Με βάση τα έως τώρα δεδομένα, έχει προσδιοριστεί και αναλυθεί η αλληλουχία των βάσεων του DNA από 85 διαφορετικούς τύπους του ιού, ενώ αριθμός μεγαλύτερος των 130 υποτύπων έχουν χαρακτηριστεί μερικώς (24).

Η χρήση ευαίσθητων μοριακών τεχνικών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) έχουν συμβάλλει στην ταυτοποίηση των περισσότερων από τους νέους τύπους HPV. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη ταξινόμηση των διαφόρων τύπων του ιού, οι διαφορές των επιμέρους γονοτύπων εντοπίζονται στην αλληλουχία των DNA νουκλεοτιδίων στις περιοχές κωδικοποίησης των E6, E7 και L1 πρωτεϊνών του ιού (Εικόνα 1) (25).

Στους λεγόμενους τύπους «χαμηλού κινδύνου» (Low Risk, LR-HPV) συγκαταλέγονται οι 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84 και 89, οι οποίοι ανιχνεύονται σε εξωφυτικά οξυτενή κονδυλώματα, σε επίπεδα κονδυλώματα και σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας. Στους τύπους «υψηλού κινδύνου» (High Risk, HR-HPV) συγκαταλέγονται οι 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 και 85, οι οποίοι ανιχνεύονται σε υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις κυρίως του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας και σε διηθητικούς καρκίνους (26). (Εικόνα 1)



Εικόνα 1. Η δομή του HPV ιικού γενώματος (27)

Οι HPV τύποι 16 και 18 ανιχνεύονται στο 3.2% και στο 1.4% αντίστοιχα των φυσιολογικών κυτταρολογικών επιχρισμάτων και συμβάλλουν σε ποσοστό 24.3% στην ανάπτυξη χαμηλόβαθμων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων (Low grade Squamous Intraepithelial Lesions - LgSIL), σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων (High grade Squamous Intraepithelial Lesions - HgSIL), στο 70% των διηθητικών καρκινωμάτων και σε ποσοστό 81.5% των λοιμώξεων που αφορούν την ανάπτυξη αδενοκαρκινωμάτων (2, 28-30). Σύμφωνα με τα δεδομένα στη βιβλιογραφία, οι τύποι αυτοί συνδέονται με εμμένουσες λοιμώξεις που οδηγούν σε τραχηλικές αλλοιώσεις με τη συχνότητα ανίχνευσης του HPV 16 να αυξάνεται όσο αυξάνεται και η βαρύτητα της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (31).

Ο HPV 45, ο οποίος απαντάται σε φυσιολογικά επιχρίσματα σε ποσοστό μόλις 0.6%, εμφανίζεται στο 2.8% των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων και σε ποσοστό 4.4% στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (22). Φαίνεται επίσης, να έχει μεγάλη συσχέτιση με τα αδενοκαρκινώματα του τραχήλου, τα οποία αποτελούν το 16% όλων των καρκίνων του τραχήλου, με τάση αύξησης της επίπτωσής τους στις αναπτυγμένες χώρες έως και το 20% των καταγεγραμμένων περιστατικών καρκίνων του τραχήλου. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται, αφενός στη χαμηλή αποτελεσματικότητα (efficacy) των προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου που εφαρμόζονται στις χώρες

αυτές ως προς τον εντοπισμό των συγκεκριμένων αλλοιώσεων στα κυτταρολογικά επιχρίσματα, και αφετέρου στην πραγματική αύξηση του ποσοστού έκθεσης των νεώτερων γενεών στον HPV 45, ως αποτέλεσμα της αλλαγής σεξουαλικών συμπεριφορών.

Συγκεκριμένα, η HPV λοίμωξη είναι δυνατό να διεγείρει τη τοπική υπερπαραγωγή των επιθηλιακών κυττάρων, η εκδήλωση της οποίας γίνεται είτε με τη μορφή των οξυτενών κονδυλωμάτων ή της ενδοεπιθηλιακής τραχηλικής νεοπλασίας (Cervical Intraepithelial Neoplasia - CIN). Σε ασθενείς με διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος, παρατηρείται αυξημένη τάση εμμονής της λοίμωξης, η οποία όταν οφείλεται σε υψηλού κινδύνου υπότυπους (HR-HPV) είναι δυνατό να οδηγήσει τελικά στη καρκινογένεση (32, 33). Από τα δεδομένα στη βιβλιογραφία προκύπτει ότι οι υπότυποι του HPV 16, 18, 45, 52, 58, 33 και 31 είναι δυνατό να ανευρεθούν στο 99.7% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας (12, 34, 35).

Ειδικότερα, ο HPV 16 είναι ο συχνότερος τύπος που απαντάται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ανεξαρτήτως ιστολογικής διάγνωσης, ενώ ο HPV 18 είναι ο δεύτερος συχνότερος τύπος σε όλο το φάσμα των αλλοιώσεων του τραχήλου, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας (29).

Η συνολική επίπτωση του ιού σε περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου, ανεξαρτήτως ιστολογικού τύπου, υπολογίζεται βάσει μελετών στο 87.2% (28, 36).

ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ HPV ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Η φυσική ιστορία της λοίμωξης από τον HPV όσον αφορά τον τράχηλο της μήτρας, είναι πολύ καλά τεκμηριωμένη. Εμμονή της HPV λοίμωξης θεωρείται η αναγκαία συνθήκη για την ανάπτυξη προκαρκινικής (CIN) και καρκινικής αλλοίωσης. Οι νέες λοιμώξεις μπορούν να εμφανιστούν σε κάθε ηλικία και είναι καλοήθεις εφόσον είναι παροδικές (37, 38). Ειδικότερα, η ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι αποτέλεσμα σειράς γεγονότων όπως αυτό της ιικής HPV προσβολής και της εμμονής της λοίμωξης, αυτό της εξέλιξης ενός κλώνου κυττάρων με εμμένουσα λοίμωξη σε προκαρκινική ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση και τελικά, την εμφάνιση διηθητικής νόσου. Συχνό είναι επίσης το φαινόμενο της πολλαπλής και ταυτόχρονης μετάδοσης διαφορετικών τύπων του HPV μεταξύ των γυναικών του γενικού πληθυσμού σε ποσοστό 20 - 30%.

Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει υποστροφή της λοίμωξης ή η εγκατάσταση εμμένουσας λοίμωξης, δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η μελέτη του πεδίου αυτού εμφανίζει περιορισμούς οι οποίοι είναι σχετιζόμενοι: α) με την απουσία αξιόπιστου μοντέλου και *in vitro* πειραματικών συστημάτων μελέτης όσον αφορά την αρχική έκθεση στον ιό, β) με τη λήψη των τραχηλικών επιχρισμάτων και την υπάρχουσα τεχνολογία ανίχνευσης του ιού και γ) με τις ελλείψεις σε αναπαραγωγίμους βιοδείκτες για τον καθορισμό του τύπου του ιού στην περίπτωση πολλαπλών μολύνσεων. Τα ανωτέρω στοιχεία καθιστούν δύσκολο τον προσδιορισμό πρωτο-λοίμωξης, επαναλοίμωξης ή αναζωπύρωσης προηγούμενης λοίμωξης (39).

Η λοίμωξη από τον ιό HPV προσβάλλει το διαφοροποιημένο επιθήλιο και όπως ήδη έχει αναφερθεί, είναι συνήθως παροδική. Οι περισσότερες λοιμώξεις αντιμετωπίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της κυτταρικής ανοσίας σε χρονικό διάστημα 15 έως 24 μηνών από την αρχική μόλυνση (40). Μετά την προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων της βασικής στιβάδας επάγεται η αναπαραγωγή και η έκφραση των γονιδίων του καψιδίου του ιού, αλλά και η παραγωγή ανοσοσφαιρινών G1 (IgG1) και IgA ενάντια στις ικές πρωτεΐνες. Ο χρόνος επώασης του ιού κυμαίνεται από 6 εβδομάδες έως και 8 μήνες από την λοίμωξη. Όταν ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή (λανθάνουσα - μη ενεργή φάση), το

χρονικό διάστημα ανάμεσα στη μόλυνση και στην πιθανή κλινική εκδήλωση της νόσου μπορεί ακόμη να ξεπερνά και τη δεκαετία (27, 41, 42).

Στην περίπτωση που το τοπικό ανοσοποιητικό σύστημα εκπέσει, αναπτύσσεται λοίμωξη παραγωγικού τύπου και εφόσον το ιικό DNA δεν έχει ενσωματωθεί ακόμα στο γενετικό υλικό του ξενιστή (επισωματική λοίμωξη), τότε τα αντίγραφα του ιού πολλαπλασιάζονται, προκαλώντας έτσι την εμφάνιση καλοήθων αλλοιώσεων (43). Αντιθέτως, εφόσον έχει προηγηθεί η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του HPV σε αυτό του ξενιστή, η εξέλιξη της βλάβης εξαρτάται από τον τύπο του HPV (Low/High Risk) και από τη συνέργεια των υποτύπων του ιού. Άλλοι παράγοντες όπως το κάπνισμα, τα αντισυλληπτικά, η εξωγενής χορήγηση ορμονών και η χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, φαίνεται να κατέχουν ενδιάμεσο ρόλο στη διεργασία αυτή (44-47).

Στις περισσότερες προοπτικές μελέτες παρατήρησης γυναικών με αρνητική κυτταρολογία και θετικό HPV DNA test, τη στιγμή της εισαγωγής του πληθυσμού στη μελέτη, ο αθροιστικός κίνδυνος (cumulative risk) εμφάνισης LgSIL στο Pap test φτάνει στο μέγιστο ποσοστό από 25 έως 50% κατά τον πρώτο και δεύτερο χρόνο παρακολούθησης, και καταλήγει σε ένα σταθερό ποσοστιαίο επίπεδο μικρότερο του 5% των επιχρισμάτων περίπου τέσσερα χρόνια αργότερα (48, 49). Επιπλέον, ο μικρός αυτός αθροιστικός κίνδυνος φαίνεται να παραμένει σταθερός για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα παρατήρησης των 15 ετών, υποδηλώνοντας έμμεσα ότι ορισμένες γυναίκες διατηρούν εμμένουσα λοίμωξη στο ίδιο χρονικό διάστημα (31, 50).

Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι προοπτικές μελέτες έχουν καταδείξει πως η εμμονή της HPV λοίμωξης, μειώνει την πιθανότητα της αυτοκάθαρσης και αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης των προκαρκινικών αλλοιώσεων (CIN) (51). Προς την κατεύθυνση αυτή, ισχυρότερος αιτιοπαθογενετικός παράγοντας θεωρείται ο HPV υπότυπος (50, 52). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο HPV 16 θεωρείται εξαιρετικά καρκινογόνος, με τον απόλυτο κίνδυνο (absolute risk) ανάπτυξης CIN να φτάνει μέχρι και το 40% μετά από 3 έως 5 έτη εμμένουσας μόλυνσης (31, 41, 52, 53).

Η μέγιστη επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, εμφανίζεται σε γυναίκες κατά δύο με τρεις δεκαετίες μεγαλύτερες από την ηλικιακή ομάδα μέγιστης επίπτωσης της μόλυνσης από τον ιό HPV (41, 54).

Παρά τους ηθικούς περιορισμούς στην επιλογή παρακολούθησης των γυναικών με υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση, ο ετήσιος κίνδυνος εξέλιξης σε καρκίνο *in situ* ή μικροδιηθητικό καρκίνο, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, υπολογίζεται από 38% έως 47% (55-57). Σύμφωνα με την ανασκόπηση των *Insinga et al.* ο συνολικός κίνδυνος υπολογίζεται στο 43% (54).

Όσον αφορά τις περιπτώσεις γυναικών με ιστολογικά επιβεβαιωμένη προκαρκινική αλλοίωση (CIN) μετά τη λήψη μικροβιοψιών, φαίνεται ότι ο κίνδυνος εξέλιξης σε διηθητικό καρκίνο είναι μικρότερος σε σχέση με αυτές στις οποίες είναι διαθέσιμη μόνο κυτταρολογική διάγνωση χαμηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (LgSIL) (58).

Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες ανασκόπησης της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, στις περιπτώσεις των αλλοιώσεων CIN1 δε φαίνεται να ελλοχεύει μεγαλύτερος κίνδυνος εξέλιξης σε CIN3 συγκριτικά με τις γυναίκες που είχαν αρνητική ιστολογική διάγνωση, όταν η λοίμωξη αφορά υψηλού κινδύνου τύπους του ιού (58). Συγκεκριμένα, η μελέτη του *Insinga et al.* το 2009, έδειξε ότι σε μέσο χρονικό διάστημα παρακολούθησης του πληθυσμού 21.9 μηνών, ο αθροιστικός κίνδυνος ανάπτυξης CIN1 αλλοίωσης φάνηκε να είναι 14.6% (54). Ο ετήσιος κίνδυνος εξέλιξης σε CIN1 υπολογίστηκε στο 83%, ενώ, ο αντίστοιχος ετήσιος κίνδυνος εξέλιξης μίας λοίμωξης από τα στελέχη HPV 16 και 18 σε CIN1, εκτιμάται να κυμαίνεται σε ποσοστό 9.4%.

Επιπρόσθετα, στις ίδιες μελέτες, όταν έγινε προσπάθεια υπολογισμού του ετήσιου κινδύνου εξέλιξης σε CIN2 και CIN3 από την αρχική HPV λοίμωξη, αυτός εκτιμήθηκε από 4.8% έως 6.7% για τις CIN2 αλλοιώσεις, και από 1.7% έως 5.3% για τις CIN3 αλλοιώσεις αντίστοιχα (54, 59).

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι όταν η λοίμωξη οφείλεται στους τύπους HPV 16 και 18, ο ετήσιος κίνδυνος εξέλιξης σε CIN2 υπολογίζεται σε 5.8%, ενώ σε CIN3 υπολογίζεται 3.5% αντιστοίχως (60).

Προγενέστερες μελέτες των *Aoyama et al* και *Shroyer et al*, είχαν δείξει ότι στο 59% των περιστατικών με CIN2 ανιχνεύθηκαν οι τύποι HPV 16 και 18. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι οι περιπτώσεις των CIN1 όπου ανιχνεύονται οι συγκεκριμένοι υπότυποι, είναι πιο πιθανό να εξελιχθούν σε CIN2, σε σχέση με τις αντίστοιχες βλάβες όπου υπάρχει προσβολή από άλλους τύπους του ιού (61, 62).

Η ετήσια εξέλιξη των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων CIN2/3 σε διηθητικό καρκίνο εκτιμάται σε χαμηλό ποσοστό, και σύμφωνα με δημοσίευση από τους Goldie et al, κυμαίνεται από 0.2 % έως 4% σε γυναίκες άνω των 65 ετών (63), ενώ ανεξαρτήτως ηλικιακής ομάδας ο εκτιμώμενος κίνδυνος κυμαίνεται από 3% έως 5% (64-67).

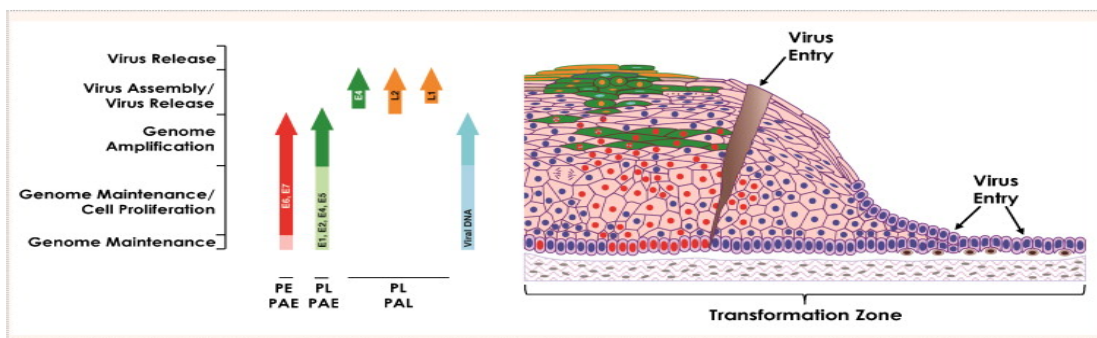
Το χρονικό διάστημα μεταξύ πρωτο-λοίμωξης και εμφάνισης μικροσκοπικά ορατής προκαρκινικής αλλοίωσης, μπορεί να είναι μικρότερο του αναμενόμενου, ακόμα και εντός πενταετίας (68), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, αναφέρεται ακόμα και δύο χρόνια μετά την έναρξη της σεξουαλικής ζωής (69-71).

Εκτός από την επιμόλυνση και την εμμονή της λοίμωξης από έναν ή περισσότερους καρκινογόνους τύπους του HPV και την απουσία οργανωμένων προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου, έχει επισημανθεί μια πλειάδα υποβοηθητικών παραγόντων, η συμβολή των οποίων δεν έχει πλήρως τεκμηριωθεί στην εμφάνιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Συγκεκριμένα, φαίνεται ο κίνδυνος επίπτωσης να διπλασιάζεται ή και να τριπλασιάζεται σε καπνίστριες, πολυτόκες και σε γυναίκες με ιστορικό μακροχρόνιας λήψης αντισυλληπτικών όταν αυτές έχουν προσβληθεί από υψηλού κινδύνου τύπους του ιού (72-74). Η επίδραση χρόνιων φλεγμονών όπως από Χλαμύδια του Τραχώματος (*Chlamydia Trachomatis*) και η επίδραση διατροφικών παραγόντων, δεν έχει επιβεβαιωθεί (75, 76). Άλλο παράγοντα κινδύνου αποτελεί και το χαμηλό κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο των γυναικών ακόμα και σε κράτη με οργανωμένα συστήματα υγείας (77). Τέλος, ο κίνδυνος εμφάνισης διήθησης δε φαίνεται να αυξάνει στατιστικά σημαντικά ακόμα και σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς όπου η επίπτωση και η εμμονή της λοίμωξης από τον ιό είναι μεγαλύτερη (78).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι ο HPV προσβάλλει το πλακώδες επιθήλιο του δέρματος και των βλεννογόνων και με μεγαλύτερη συχνότητα τον οπίσθιο κολπικό θόλο και τη Ζώνη Μετασχηματισμού - Μετάπτωσης (Transformation Zone - TZ) του τραχήλου της μήτρας. Η επικρατούσα θεωρία σχετικά με την είσοδο και την εγκατάσταση του ιού είναι ότι διαμέσου μικροτραυματισμών του επιθηλίου ο HPV προσκολλάται σε ειδικούς επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς, όπως για παράδειγμα η α6-ιντεγκρίνη, με την οποία συνδέεται ο τύπος HPV 6. Άλλες κυτταρικές επιφανειακές πρωτεΐνες, όπως η θειική ηπαράνη, με την οποία συνδέονται οι τύποι HPV 16 και HPV 33, έχει αποδειχθεί ότι χρειάζεται έναν δεύτερο κυτταρικό υποδοχέα, έναν πρωτεογλυκανικό σταθεροποιητή, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διείσδυση του ιού στο κύτταρο-στόχο (79-83).

Μετά τη διείσδυση του ιού στο κύτταρο, ακολουθεί λύση του καψιδίου στο κυτταρόπλασμα και το DNA του ιού διεισδύει μέσω της πυρηνικής μεμβράνης στον πυρήνα του κυττάρου. Η προσβολή της βασικής στιβάδας από τον ιό είναι επισωματική, με τη μορφή πλασμιδίου, και στη συνέχεια γίνεται η σύνθεση του ιικού DNA χρησιμοποιώντας ως μηχανισμό αντιγραφής αυτόν του DNA του κυττάρου-ξενιστή. Στη φάση αυτή εκφράζονται τα πρώιμα γονίδια που αφορούν τη σύνθεση του DNA του ιού. Η διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων της βασικής στιβάδας, οδηγεί τον ιό προς πιο επιφανειακά στρώματα και στην έκφραση των όψιμων γονιδίων του που σχετίζονται με τις δομικές πρωτεΐνες του ιού. Στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα ο πολλαπλασιασμός του γονιδιώματος γίνεται σε πολλά αντίγραφα ενώ παράλληλα συντίθενται τα καψομερίδια και συγκροτούνται τα ιικά σωματίδια (Εικόνα 2) (41).



Εικόνα 2. Ο κύκλος ζωής των HR HPV υποτύπων στο επιθήλιο του τραχήλου (27)

Η ενσωμάτωση του DNA του ιού στο γένωμα του ξενιστή έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της έκφρασης του E2 γονιδίου, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες καταστέλλει την έκφραση των E6 και E7 γονιδίων. Αποτέλεσμα της διεργασίας αυτής, είναι η υπερέκφραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αθανατοποίηση κυττάρων *in vitro*, απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αναστολή της διαδικασίας απόπτωσης και τελικά να επάγουν τη δημιουργία όγκων (84).

Η E6 ογκοπρωτεΐνη μπορεί να προσδεθεί στην πρωτεΐνη p53, η οποία ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην καταστολή της ογκογενετικής διεργασίας. Όταν η E6 ογκοπρωτεΐνη προέρχεται από γονότυπους χαμηλού κινδύνου, η σύνδεση αυτή δεν επάγει την αποικοδόμησή της λόγω σχηματισμού ασθενούς συμπλόκου. Αντιθέτως, στην περίπτωση των ιών υψηλού κινδύνου, το σύμπλοκο της E6 με την p53 είναι ισχυρό και οδηγεί στην ταχεία αποικοδόμησή της μέσω ενός πρωτεολυτικού συστήματος και της πρωτεΐνης ουβικουϊτίνης (85, 86).

Η E7 ογκοπρωτεΐνη προσδέεται σε πρωτεΐνες της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος απελευθερώνοντας μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο E2F, οι οποίοι ενεργοποιούν τα κυτταρικά γονίδια που σχετίζονται με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα, η σύνδεση της E7 με τις κυκλίνες A και E και ο σχηματισμός συμπλόκων κατά τη φάση G1 και S του κυτταρικού κύκλου, απορρυθμίζει τη λειτουργία των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cdks) και οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (85, 86).

Η απουσία θετικής χρώσης για τις πρωτεΐνες του ρετινοβλαστώματος με τεχνικές ανοσοκυτταροχημείας, συσχετίζεται με εξέλιξη της νόσου, ενώ για την p53 δεν φαίνεται να ισχύει το ίδιο καθώς στα φυσιολογικά κύτταρα είναι σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (87). Η ειδικότητα και η ευαισθησία των θετικών στην p53 δειγμάτων για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας φαίνεται να μην αξιολογείται τόσο όσο ο πολυμορφισμός Pro72Arg της πρωτεΐνης, ο οποίος συσχετίζεται με την πρόσδεση της p53 με την E6 ογκοπρωτεΐνη. Για την πρωτεΐνη του Rb χρησιμοποιείται κυρίως η ανοσοδοκιμασία κατά Western με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για την ανίχνευση της υπερ-φωσφορυλιωμένης (ανενεργής) ή της υπο-φωσφορυλιωμένης (ενεργής) μορφής της. Η σημασία της δεν έχει καθοριστεί ακόμη για τον καρκίνο του

τραχήλου της μήτρας αφού η αποικοδόμησή της επάγεται από την E7 πρωτεΐνη του HPV (88).

Διαφαίνεται λοιπόν, ότι η μη ελεγχόμενη έκφραση των E6 και E7 ιικών ογκογονιδίων και η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο DNA του κυττάρου ξενιστή προκαλεί χρωμοσωμική αστάθεια, το σημαντικότερο γεγονός ίσως στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Το φαινόμενο της ενσωμάτωσης πολύ σπάνια ανιχνεύεται σε πρώιμες και χαμηλόβαθμες αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας (89-95).

Τρεις μηχανισμοί έχουν προταθεί ενισχύοντας τη θεωρία της ενσωμάτωσης του γενώματος. Ο πρώτος σχετίζεται με την απώλεια της έκφρασης του E2 γονιδίου του ιού στα κύτταρα που έχει γίνει ενσωμάτωση του DNA του ιού και την επαγωγή της υπερέκφρασης των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών μέσω της απελευθέρωσης του ιικού «προωθητή». Ο δεύτερος μηχανισμός αναφέρεται στη δράση κυτταρικών αλληλουχιών, οι οποίες μπορούν να ενισχύσουν τη δράση του «προωθητή» στην υπερέκφραση των E6 και E7 ογκογονιδίων αλλά και ταυτόχρονα να επάγουν τη σταθεροποίηση των ήδη ενσωματωμένων E6/E7 αντιγράφων του ιικού γενώματος ενισχύοντας το ογκογόνο δυναμικό τους (96-98). Ο τρίτος μηχανισμός σχετίζεται με το φαινόμενο της «ένθετης μεταλλαγής», όπου τα ενσωματωμένα γονίδια του ιού μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση κυτταρικών ογκογονιδίων ή και στην απενεργοποίηση άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων (93, 99, 100).

Ωστόσο, σύμφωνα με ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, η ενσωμάτωση του ιού δεν αποτελεί αναγκαία συνθήκη καρκινικής εξαλλαγής και η διεργασία της καρκινογένεσης φαίνεται να επάγεται μέσω και διαφορετικών οδών (pathways) (101). Επιπρόσθετα, υποστηρίζεται από ορισμένους ερευνητές ότι η μη ελεγχόμενη έκφραση των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια με αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του γενώματος του ιού, χωρίς η τελευταία να είναι ο εκλυτικός παράγοντας της χρωμοσωμικής αστάθειας (102). Προς την κατεύθυνση αυτή, η μελέτη του χρονικού μεσοδιαστήματος μεταξύ της ενσωμάτωσης και της διασποράς των κυτταρικών αντιγράφων κατέδειξε ότι η ανευπλοειδία προηγείται της εξάπλωσης των ενσωματωμένων ιικών κλώνων (103).

Ο ρόλος του p16^{INK4A} στην καρκινογένεση

Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών E6 και E7 οδηγεί σε υπερέκφραση του βιοδείκτη p16^{INK4a}, καθώς στόχος των ιικών ογκοπρωτεϊνών μετά την προσβολή του κυττάρου από τον ιό του HPV είναι ο κύκλος p16^{INK4a}-Rb, ο οποίος σχετίζεται με τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα, προκαλείται υπερέκφραση του p16^{INK4a} λόγω άμεσης ή έμμεσης αδρανοποίησης της πρωτεΐνης του Rb (104).

Στην παραγωγική λοίμωξη από τον ιό HPV, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ογκοπρωτεΐνη E7 αναστέλλει τη δημιουργία συμπλόκου p16^{INK4a}-Rb-E2F με αποτέλεσμα τα κύτταρα να υπερεκφράζουν p16^{INK4A} μέσω αρνητικού feedback, αλλά καθώς ο E2F παράγοντας δεν απελευθερώνεται μέσω CDK4/6 αλλά μέσω της ογκοπρωτεΐνης E7, προκαλείται μια παράδοξη αύξηση των επιπέδων της p16^{INK4A} χωρίς να επηρεάζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου (105).

Σύμφωνα με κλινικές μελέτες, η μοναδική ιδιότητα του βιοδείκτη p16^{INK4A} να εκφράζεται ανεξαρτήτως του γονοτύπου, τον καθιστά κλινικά σημαντικό ανάμεσα στους άλλους HPV-συσχετιζόμενους βιοδείκτες (106). Επιπλέον, σε αντίθεση με άλλους καρκινικούς δείκτες ο p16^{INK4A} σχετίζεται με τη διαδικασία γηρασμού του κυτταρικού κύκλου και δεν εκφράζεται σε φυσιολογικά κύτταρα ή κύτταρα που ακολουθούν φυσιολογική αναπαραγωγική διαδικασία (107).

Η συγκέντρωσή του στον πυρήνα και στο κυτταρικό κυτταρόπλασμα ανιχνεύεται σε μεγάλο αριθμό προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας μέσω ανοσολογικών χρώσεων. Έτσι, σύμφωνα με τις υπάρχουσες ανοσοδοκιμασίες, η έκφραση της p16^{INK4A} πρωτεΐνης σε φυσιολογικά διαφοροποιημένα κύτταρα είναι σε χαμηλά και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα με ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους, ενώ στα προσβεβλημένα από ογκογόνους τύπους του HPV κύτταρα, τα επίπεδα της p16^{INK4A} πρωτεΐνης έχουν βρεθεί να είναι υψηλότερα (107).

Το CINtec® Cytology Kit είναι μια δοκιμασία ανοσοκυτταροχημείας για την ποιοτική ανίχνευση του p16^{INK4a} αντιγόνου σε κολποτραχηλικά επιχρίσματα κατά την οποία μετά την επεξεργασία και την μονιμοποίηση του τραχηλικού επιχρίσματος, επάγεται η θερμική ανάκτηση του επιτόπου και η επεξεργασία των δειγμάτων σε μηχανήμα Autostainer. Χρησιμοποιείται μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού E6H4TM, ως

παράγοντας παρεμπόδισης της περοξειδάσης και του πρωτογενούς αντιγόνου p16^{INK4a}. Στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά ένας παράγοντας οπτικοποίησης και το διάλυμα υποστρώματος-χρωμογόνου. Η αντίδραση του χρωμογόνου βασίζεται στη μετατροπή του σε ορατό προϊόν αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου με τη μεσολάβηση του παράγοντα οπτικοποίησης (περοξειδάση του χρένου). Τέλος, τα πλακίδια απομακρύνονται από το Autostainer, προστίθεται αντιχρώση αιματοξυλίνης και ακολουθεί μονιμοποίηση με DPX (108-110).

Κύριο μειονέκτημα των μεθόδων ανοσοκυτταρικού και ανοσοϊστοχημικού προσδιορισμού της p16^{INK4A}, είναι η έλλειψη επαρκών κριτηρίων ερμηνείας του ποσοστού θετικότητας των κυττάρων και της πυρηνικής ή και κυτταροπλασματικής χρώσης καθώς και του καθορισμού της κλινικής σημασίας του αποτελέσματος (111).

Επιγενετικά φαινόμενα

Έχει αποδειχθεί ότι η ενσωμάτωση του μικρού DNA στο κυτταρικό γονιδίωμα προκαλεί γενετικά (ελλείψεις, προσθήκες και μεταθέσεις του DNA) και επιγενετικά (αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA και εκτροπή της έκφρασης του micro RNA) φαινόμενα (112-114). Τα miRNAs είναι μικρά, μη κωδικοποιημένα μόρια RNA τα οποία αποτελούνται από 22-25 νουκλεοτίδια. Τα μόρια αυτά έχουν επισημανθεί σαν επιγενετικοί ρυθμιστές ελέγχοντας τη γονιδιακή έκφραση χωρίς να μεταβάλλουν τις αλληλουχίες του DNA. Ο εντοπισμός των miRNAs σε κυτταρολογικά και ιστολογικά επιχρίσματα καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας, συνηγορεί στο ότι η εκτροπή της έκφρασής τους σχετίζεται με εξέλιξη της νόσου. Διαταραχές στην έκφραση των miRNAs έχουν συσχετισθεί με γονιδιακές μεταλλάξεις όπως ελλείψεις, προσθήκες και μεταθέσεις αλλά και επιγενετικές μεταβολές όπως η ακετυλίωση ιστονών και η εκτροπή DNA μεθυλίωσης (115, 116).

Σε φυσιολογικά κύτταρα, τέτοιου είδους επιγενετικά φαινόμενα όπως η μεθυλίωση DNA, η ακετυλίωση ιστονών και η έκφραση miRNAs, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της διαδικασίας διαφοροποίησης και σε κυτταρικές λειτουργίες που σχετίζονται με την αιμόσταση

του κυττάρου. Ο επιγενετικός μηχανισμός που έχει μελετηθεί ευρέως είναι η μεθυλίωση του DNA, μία αναστρέψιμη διαδικασία η οποία επάγεται από το ένζυμο DNA μεθυλοτρανσφεράση (DNMT). Η μεθυλοτρανσφεράση DNMT1, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας της μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικής διαίρεσης (117, 118).

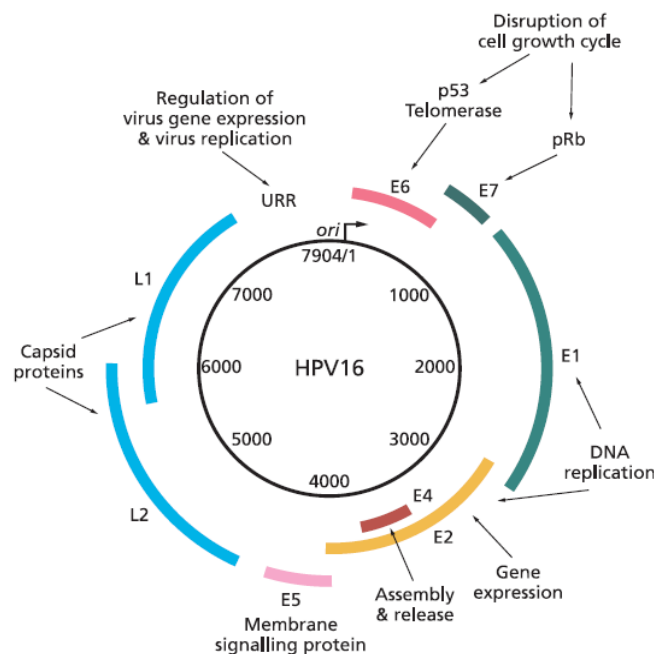
Η επαγωγή των επιγενετικών φαινομένων φαίνεται ότι συσχετίζεται με τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 οδηγώντας στην αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και στην υπερέκφραση ογκογονιδίων, επάγοντας την εξέλιξη της νόσου (119). Προς την κατεύθυνση αυτή, έχουν περιγραφεί τρεις μηχανισμοί επιγενετικής αποσιώπησης miRNA γονιδίων κατά τη διαδικασία της τραχηλικής καρκινογένεσης. Αναλυτικότερα, τα γονίδια αυτά εντοπίζονται σε εύθραυστες περιοχές όπου το ικκό DNA μπορεί να ενσωματωθεί ευκολότερα, η έκφρασή τους στο κύτταρο στόχο μπορεί να επηρεαστεί από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το ικκό DNA και τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι οι ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση DNA μεθυλοτρανσφερασών, τα οποία είναι ένζυμα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεθυλίωσης προωθητών (promoter regions) (112, 120-122).

Η εκτροπή της μεθυλίωσης των προωθητών των miRNAs είναι ένας σημαντικός μηχανισμός απορρύθμισης της έκφρασης τους στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (122-124). Οι E6 και E7 ογκοπρωτεΐνες ενισχύουν τη δράση της τρανσφεράσης DNMT1 μέσω δύο μηχανισμών: α) έμμεσα, μέσω πρόσδεσης της E7 με την πρωτεΐνη Rb και την απελευθέρωση του μεταφραστικού παράγοντα E2F, ο οποίος ενεργοποιεί τη δράση του προωθητή της DNMT1 και β) άμεσα, με την πρόσδεση της E7 με την τρανσφεράση DNMT1 (125).

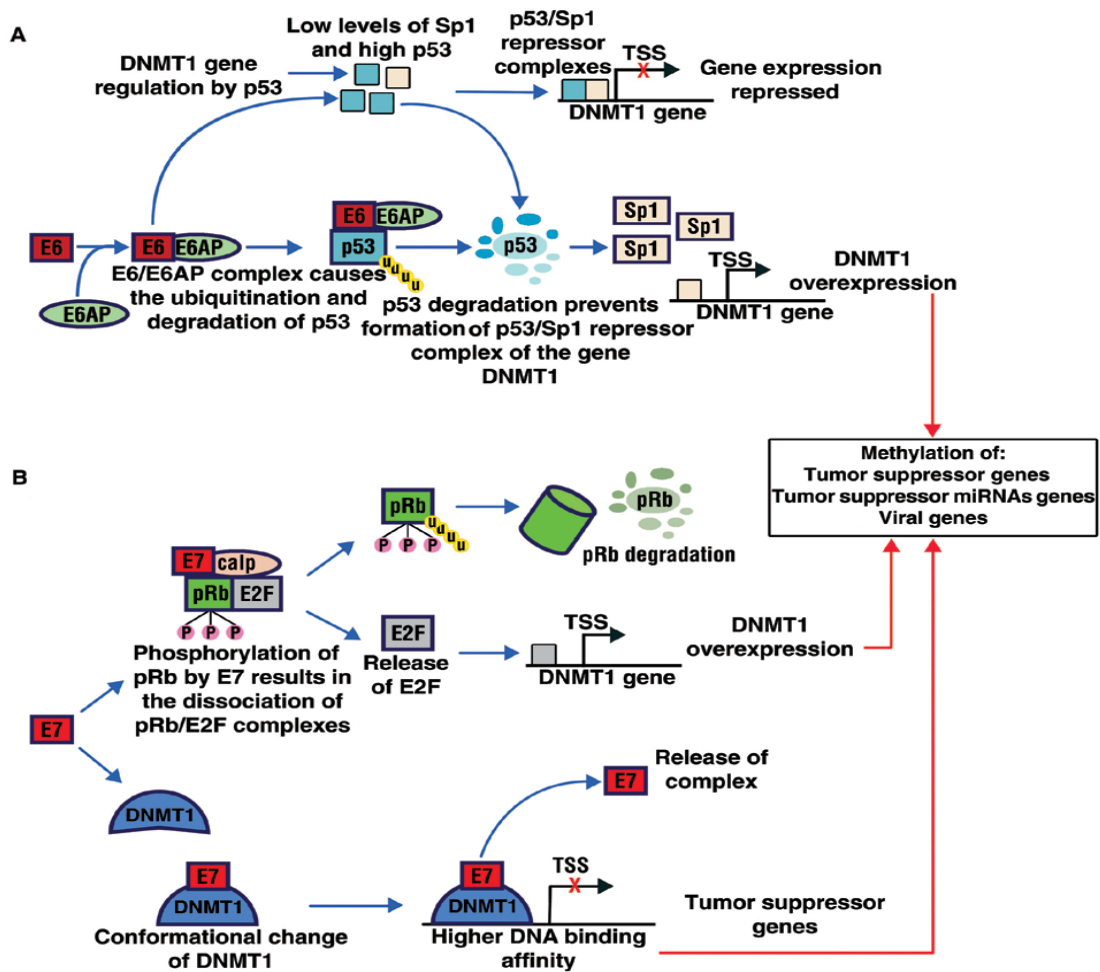
Έχει προταθεί ότι το σύμπλοκο E7/DNMT1 οδηγεί σε δομικές αλλαγές της DNMT1 με αποτέλεσμα την έκθεση της ενεργοποιημένης περιοχής της, την προώθηση της σύνδεσης DNMT1/DNA και τη σύνδεση στην S-adenosyl-L-methionine (AdoMet). Μετά τη δημιουργία του συμπλόκου E7/DNMT1/DNA, η E7 αποδεσμεύεται και το σύμπλοκο DNMT1/DNA σταθεροποιείται (119). Στη συνέχεια, η αυξημένη δράση της DNMT1 επάγει τη μεθυλίωση του κυτταρικού γενώματος οδηγώντας στην αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και την κυτταρική μετάλλαξη (Εικόνα 3) (126, 127).

Ο ρόλος της μεθυλοτρανσφεράσης DNMT1 στη διαδικασία καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας έχει μελετηθεί σε συνθήκες in vitro και in vivo και έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την τραχηλική καρκινογένεση (128). Η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο κύτταρο ξενιστή είναι απαραίτητη συνθήκη στη διαδικασία της τραχηλικής καρκινογένεσης και οι αλλαγές στη μεθυλίωσή του συνδέονται με το ογκογόνο δυναμικό του ιού HPV. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο το HPV ιικό DNA επεμβαίνει στη διαδικασία μεθυλίωσης δεν έχει ακόμη πλήρως διαλευκανθεί στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχουν εντοπιστεί μεθυλιώσεις που αφορούν τα γονίδια p16^{INK4A}, IGSF4 (ImmunoGlobulin SuperFamily, member 4), DAPK1 (Death-Associated Protein Kinase), RARB (Retinoic Acid Receptor, Beta), TWIST (Twist homolog 1), SPARC (Secreted Protein, Acidic, Cysteine-rich) και TFPI2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2). Σύμφωνα με τις υπάρχουσες μελέτες, η ειδικότητα ανίχνευσης των μεθυλίωσεων των γονιδίων DAPK1, TWIST και RARB είναι στατιστικά σημαντική καθώς εντοπίζεται στο 57% των CIN3 και στο 74% των διηθητικών καρκινωμάτων (129). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανίχνευση της μεθυλίωσης υποκινητών είναι η Methylation Specific PCR και η μέθοδος Sequencing (Καθορισμός αλληλουχίας του DNA με διδεοξυνουκλεοτίδια).



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα της δομής του HPV 16 ιικού γενώματος όπου αναδεικνύεται η θέση και η σύντομη περιγραφή του κάθε γονιδίου (130)



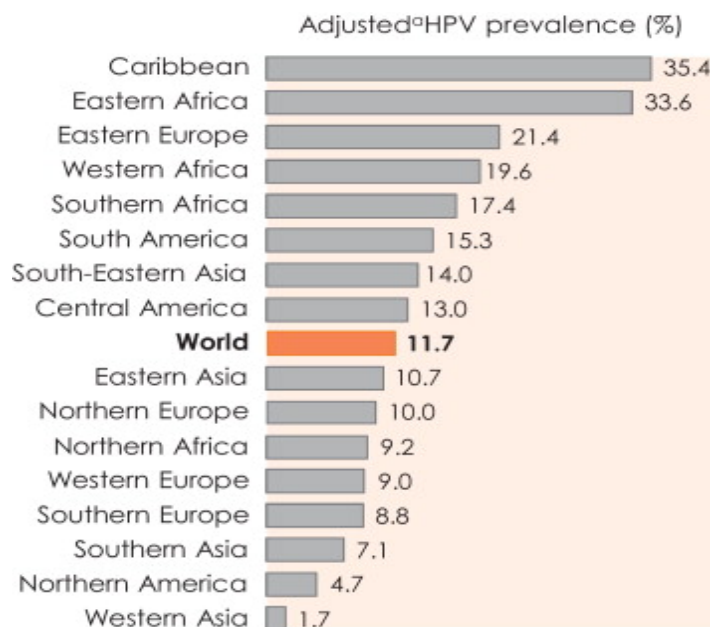
Εικόνα 3. Ρύθμιση του ιικού και κυτταρικού γονιδιώματος από τις E6 και E7 ογκοπρωτεΐνες των HR-HPV. Η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο κυτταρικό γονιδίωμα προκαλεί γενετικά και επιγενετικά φαινόμενα (127)

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΑΖΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Συμβατική Κυτταρολογία

Μία πληθώρα συστημάτων έχει χρησιμοποιηθεί στην ταξινόμηση των προκαρκινικών κυτταρικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας. Πρώτο σύστημα ταξινόμησης είναι αυτό κατά Γ. Παπανικολάου αποτελούμενο από πέντε βαθμίδες. Στη βαθμίδα 1 υπάγονται τα αρνητικά κυτταρολογικά επιχρίσματα και στη βαθμίδα 5 τα θετικά (Πίνακας 1). Το 1953 ο Reagan εισάγει τον όρο «δυσπλασία» με σκοπό την περιγραφή των προκαρκινικών αλλοιώσεων (131). Το 1960 χρησιμοποιείται για πρώτη φορά η έννοια της κυτταρικής ενδο-επιθηλιακής νεοπλασίας (Cervical Intraepithelial Neoplasia - CIN) από τον Richart (132-134). «Δυσπλασία» και «CIN» χρησιμοποιούνται αρχικά στην περιγραφή ιστολογικών αλλοιώσεων ενώ στη συνέχεια στην περιγραφή κυτταρολογικών επιχρισμάτων.

Η παγκόσμια επίπτωση της λοίμωξης σε γυναίκες με φυσιολογική κυτταρολογία κυμαίνεται βάσει στοιχείων μεταξύ 11% -12%, με τη μεγαλύτερη επίπτωση να εμφανίζεται στη κεντρική και νότιο Αφρική (24%), την Ανατολική Ευρώπη (21%) και τη Λατινική Αμερική (16%) (Εικόνα 4) (30).



Εικόνα 4. Ο επιπολασμός του HPV μεταξύ γυναικών με φυσιολογική κυτταρολογία: μετα-ανάλυση βασισμένη σε αποτελέσματα από 1,016,719 γυναίκες (30).

Η ταξινόμηση κατά Bethesda των τραχηλικών κυτταρολογικών επιχρισμάτων, αποτελεί προσπάθεια καθιέρωσης μιας παγκόσμιας κοινά αποδεκτής κυτταρικής ορολογίας. Το 1989 γίνεται το πρώτο Workshop του National Cancer Institute κατά τη διάρκεια του οποίου πραγματοποιείται η αντικατάσταση της προϋπάρχουσας προκαρκινικής ορολογίας με αυτή των δύο βαθμίδων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων: α) χαμηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (Low grade Squamous Intraepithelial Lesion, LgSIL) και β) υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (High grade Squamous Intraepithelial Lesion, HgSIL) (Πίνακας 1). Καινοτομία της ταξινόμησης του Bethesda αποτέλεσε και η ανάπτυξη των κριτηρίων που στοιχειοθετούν ένα κυτταρικό επίχρισμα ώστε αυτό να θεωρείται επαρκές (135, 136).

Στο Ηνωμένο Βασίλειο χρησιμοποιείται ένα σύστημα ταξινόμησης των τραχηλικών κυτταρολογικών επιχρισμάτων που χρησιμοποιεί τον όρο «δυσκαρύωση». Με βάση την ταξινόμηση αυτή, η σοβαρού βαθμού (severe dyskaryosis) και η μετρίου βαθμού δυσκαρύωση (moderate dyskaryosis) αντιστοιχούν σε υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του πλακώδους επιθηλίου (HgSIL) στο σύστημα Bethesda. Η ήπια δυσκαρύωση (mild dyskaryosis) και η ενδιάμεσου βαθμού ατυπία (HPV κυτταρολογικές αλλοιώσεις), αντιστοιχούν σε χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου (LgSIL) κατά Bethesda, όπως επίσης και η πλακώδης ατυπία αντιστοιχεί στα άτυπα πλακώδη κύτταρα αδιευκρίνιστης σημασίας (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-ASCUS) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Ταξινόμηση κυτταρολογικών δειγμάτων από τον τράχηλο της μήτρας

Παπανικολάου	Δυσκαρύωση	Bethesda 1991
I	Φυσιολογικό	Εντός φυσιολογικών ορίων
II	Φλεγμονώδης ατυπία	Φλεγμονώδης αντίδραση
IIIR	-	Αντιδραστικές αλλοιώσεις
	Πλακώδης ατυπία	Άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (ASCUS)
III	HPV ατυπία	Χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (LgSIL)
IV	Ήπια δυσκαρύωση	
V	Μέτρια δυσκαρύωση Σοβαρή δυσκαρύωση Καρκίνωμα in-situ	Υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (HgSIL)

Η ταξινόμηση κατά Bethesda αναθεωρήθηκε το 2002 με κύρια διαφοροποίηση από την προηγούμενη ταξινόμηση την περαιτέρω διαίρεση των ASCUS σε ASC-US (άτυπα πλακώδη κύτταρα αδιευκρίνιστης σημασίας) και ASC-H (Atypical Squamous Cells; cannot exclude High-grade squamous intraepithelial lesion - άτυπα πλακώδη κύτταρα χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία) (137).

Κυτταρολογία Υγρής Φάσης (Liquid Based Cytology)

Η ευαισθησία του Pap-test για τη διάγνωση των προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου κυμαίνεται μεταξύ 30 και 80%, με υπολογιζόμενη μέση τιμή στο 47%, ενώ η ειδικότητά του φαίνεται να είναι υψηλότερη από 79% έως και 100% με μέση τιμή αυτής να φτάνει το 95% (138). Παρότι η ευαισθησία του Pap test μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτή, δεν είναι η αναμενόμενη για ένα test που στοιχειοθετεί τον βασικό άξονα προγραμμάτων μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου. Το υψηλό ποσοστό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (14% - 33%) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αδυναμίες του Pap test και οφείλεται κυρίως σε λάθη κατά τη συλλογή του δείγματος, λόγω ανεπαρκούς λήψης ή ακόμη λόγω απώλειας κυττάρων από το παρασκεύασμα (139-143).

Ο Hutchinson et al το 1999, έδειξαν ότι κατά τον συμβατικό κυτταρολογικό τρόπο λήψης επιχρίσματος, συλλέγονται κατά κανόνα από 600.000 έως 1.200.000 τραχηλικά επιθηλιακά κύτταρα με ποσοστό μικρότερο του 20% των κυττάρων αυτών να μεταφέρονται στο πλακίδιο (144). Ένας από τους λόγους που εξηγεί το υψηλό ποσοστό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, είναι η αδυναμία μεταφοράς της πλειονότητας των επιθηλιακών κυττάρων στο πλακίδιο. Επιπρόσθετα, η προετοιμασία του test και η μεταφορά του υλικού της δειγματοληψίας στο πλακίδιο εξαρτάται σημαντικά τόσο από τον παρασκευαστή όσο και από άλλες παραμέτρους, αφού στο 15% των δειγμάτων εμφανίζεται πρόσμιξη με ερυθρά αιμοσφαίρια, επιμόλυνση από φλεγμονώδη κύτταρα ή και επικάλυψη από στρώμα επιθηλιακών κυττάρων (145).

Σε αντιδιαστολή, η κυτταρολογία υγρής φάσεως (Liquid Based Cytology - LBC) εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Ειδικότερα, επιτυγχάνεται η συλλογή

μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων σε μονιμοποιητικό υγρό και στη συνέχεια δίνεται η δυνατότητα αυτοματοποιημένης επεξεργασίας του δείγματος. Το υπολειπόμενο δείγμα έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ώστε να πραγματοποιηθούν άλλες συμπληρωματικές εξετάσεις για HPV-σχετιζόμενους βιοδείκτες ή ακόμη και άλλες εξετάσεις για την εξέταση σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων όπως είναι ο έλεγχος για χλαμύδια, γονόρροια και Herpes Simplex Virus (HSV).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) παρουσιάζεται το ποσοστό εμφάνισης των διαφόρων βαθμίδων κυτταρολογικών αλλοιώσεων τόσο σε συμβατικό Pap test, όσο και στην κυτταρολογία υγρής φάσης, βάσει των στοιχείων από κυτταρολογικά εργαστήρια στην Αμερική την περίοδο από το 2002 έως το 2003 (146).

Πίνακας 2: Συχνότητα εμφάνισης κυτταρολογικών αλλοιώσεων

	Pap-test	LBC
ASC-US	3.8%	4.76%
ASC-H	0.48%	0.55%
LSIL	2.1%	2.9%
HSIL+	0.7%	0.84%

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ HPV

Οι σύγχρονες διαθέσιμες χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης και τυποποίησης του HPV, επιτρέπουν με αξιοπιστία την ποσοτική και ποιοτική διερεύνηση της επισωματικής ή ενσωματωμένης μορφής του ιού. Ειδικότερα, δοκιμασίες βασιζόμενες στον εντοπισμό του DNA του ιού ανιχνεύουν την παρουσία του ιικού γενώματος, ενώ όταν στόχος είναι το RNA γίνεται ανίχνευση της έκφρασης των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών.

Σε μετα-ανάλυση από τον Lorincz et al, σχετικά με την ευαισθησία, την ειδικότητα, τη θετική και αρνητική προγνωστική αξία στην ανίχνευση του ιού από το HPV DNA test, συγκρίνοντας συμβατικά επιχρίσματα με επιχρίσματα υγρής φάσης, προέκυψε ότι η ευαισθησία του Pap test μαζί με το HPV-DNA test είναι υψηλότερη από την ευαισθησία των μεθόδων μεμονωμένα, ενώ ο συνδυασμός των μεθόδων δεν κατέδειξε υψηλότερη ειδικότητα. Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης ήταν διφορούμενα όσον αφορά τη θετική προγνωστική αξία τόσο για το συνδυασμό των μεθόδων όσο και για το κάθε test ως μεμονωμένη μέθοδο. Τέλος, η αρνητική προγνωστική αξία του HPV DNA test σε συνδυασμό με το Pap test σε ορισμένες από τις μελέτες έφτανε το 100% (147).

Συνεπώς, διαφαίνεται ότι οι τεχνικές ανίχνευσης του HPV DNA, οι οποίες στηρίζονται στην ανίχνευση της L1 δομικής περιοχής του ιού, δεν αποτελούν τόσο ακριβή μέθοδο καθώς η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται αργά στον κύκλο ζωής του ιού, σε αντίθεση με την ανίχνευση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Ειδικότερα, η ενσωμάτωση του ιικού DNA σε αυτό του κυττάρου ξενιστή έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της L1 περιοχής και στην περίπτωση αυτή οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης του HPV DNA θα έχουν ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα παρά την ύπαρξη ογκογόνου δυναμικού. Επιπρόσθετα, η γονιδιακή έκφραση του ιού διαφέρει στις διάφορες στιβάδες του πλακώδους επιθηλίου και εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη βαρύτητα της προκαλούμενης ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (89, 148).

Τα δεδομένα αυτά, οδήγησαν στη χρήση της κυτταρολογίας υγρής φάσης, η οποία επιτρέπει την εφαρμογή μοριακών και ανοσοϊστοχημικών μεθόδων για την τυποποίηση και την ανίχνευση του mRNA των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας την κυτταρολογία υγρής φάσης για τη λήψη

τραχηλικού επιχρίσματος, τα δείγματα περιέχουν αντιπροσωπευτική αναλογία τραχηλικών κυττάρων, με καθαρό υπόστρωμα και η διάκριση του πυρήνα είναι λεπτομερής, με εμφανέστερη κατανομή της χρωματίνης, του πυρηνίου και της πυρηνικής μεμβράνης. Παράλληλα, φαίνεται ότι ο συνολικός διαγνωστικός χρόνος του εργαστηρίου μειώνεται σε ποσοστό κατά 40%.

Τέτοιες μέθοδοι τυποποίησης, οι οποίες αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια είναι:

1. Τεχνικές βασιζόμενες στον υβριδισμό (π.χ. υβριδισμός και ανίχνευση ενδοκυττάρου mRNA με κυτταρομετρία ροής)
2. Τεχνικές βασιζόμενες στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων (π.χ. αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων βασισμένη στην αλληλουχία (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA))
3. Τεχνικές βασιζόμενες σε συνδυασμό των ανωτέρω (π.χ. HPV DNA μικροσυστοιχίες)

Τεχνικές βασισμένες σε Υβριδισμό

Οι τεχνικές υβριδισμού στηρίζονται στη συμπληρωματικότητα των βάσεων των αλυσίδων του DNA και παράλληλα στην ιδιότητα τους να διαχωρίζονται κάτω από συνθήκες υψηλού PH ή υψηλής θερμοκρασίας. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούν σημασμένο DNA με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υβριδίου, ενός δίκλωνου DNA με τον ένα κλάδο του το υπό ανίχνευση DNA και τον άλλο κλάδο του το σημασμένο DNA. Συνεπώς, σε δείγμα που περιέχει ιικό DNA θα σχηματισθεί ένα υβρίδιο, το οποίο θα είναι σημασμένο ανιχνεύοντας την ύπαρξη του ιού. Χρησιμοποιώντας ραδιενεργή σήμανση φαίνεται ότι η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνει σημαντικά. Ειδικότερα, μόνο αλυσίδες με απολύτως ομόλογες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων θα σχηματίσουν υβρίδια ανιχνεύοντας μόνο τον απολύτως ομόλογο ως προς τον συγκεκριμένο DNA ιχνηθέτη HPV τύπο. (149).

Southern blot

Με τη μέθοδο αυτή το κυτταρικό DNA απομονώνεται από τα τραχηλικά επιχρίσματα και με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (όπως π.χ. PstI, DdeI, HaeIII, HinfI, BamHI) προκαλείται λύση του ανάλογη με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Ακολουθεί ο

καταμερισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση και η μετατροπή του σε μονοκλωνικό. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε στερεό μέσο μέσω μεμβράνης η οποία περιέχει ειδικές αλληλουχίες DNA με συμπληρωματικό μονοκλωνικό DNA ή RNA, που είναι φορτισμένα με ραδιενεργά μόρια. Κάτω από ειδικές συνθήκες κάθε αλληλουχία θα υποστεί υβριδισμό με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι υψηλή αλλά απαιτεί μεγάλη ποσότητα DNA της τάξεως των 10ng (149).

Dot blot

Η μέθοδος αυτή αποτελεί απλοποιημένη παραλλαγή της Southern blot, κατά την οποία το κυτταρικό DNA τοποθετείται απευθείας στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης χωρίς να έχει προηγηθεί λύση και ηλεκτροφόρηση. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι χαμηλότερη και απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα ολικού DNA της τάξεως των 500 ng (149).

Υβριδισμός In Situ (ISH)

Η μέθοδος ISH αποτελεί και αυτή μια πιο απλοποιημένη μορφή του Southern blot καθώς τα κύτταρα τοποθετούνται απευθείας σε στερεό μέσο για την ανίχνευση και τυποποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA ή RNA. Ωστόσο, τα δείγματα αρχικά υφίστανται πρωτεόλυση για την αποκάλυψη του κυτταρικού DNA. Εδώ ο σχηματισμός υβριδίου μεταξύ των ομολόγων αλληλουχιών ανιχνεύεται με βιοτίνη ή με ραδιενεργή σήμανση. Τεχνικές που χρησιμοποιούν την ISH είναι η FISH (fluorescent in situ hybridization) και η NISH (non-isotopic in situ hybridization). Η ευαισθησία της μεθόδου παραμένει χαμηλή (149-151).

Υβριδισμός σε διάλυμα (Hybrid Capture 2)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί υβριδισμό υγρής φάσης. Ειδικότερα η επεξεργασία του εξαγόμενου κυτταρικού DNA γίνεται σε αλκαλικό διάλυμα όπου αναμειγνύεται με μείγμα RNA μονόκλωνων ιχνηθετών (13 τύπους υψηλού κινδύνου 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,68 και 5 τύπους χαμηλού κινδύνου 6, 11, 42, 43 και 44). Τα παραγόμενα DNA/RNA υβρίδια ακινητοποιούνται με τη βοήθεια ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων και ανιχνεύονται με χημειοφωταύγεια. Η μέθοδος

εμφανίζει υψηλή ευαισθησία, η οποία ανέρχεται στο 94% σε περιπτώσεις ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων υψηλού βαθμού (149, 152-156). Παράλληλα, το Hybrid Capture 2 έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες παγκοσμίως οι οποίες απέδειξαν ότι το συγκεκριμένο test θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος screening για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (157, 158).

Υβριδισμός σε διάλυμα 3^{ης} γενεάς (Hybrid Capture 3, HC3)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί RNA ιχνηθέτες και τον υβριδισμό DNA/RNA σε διάλυμα. Επιπλέον γίνεται η χρήση βιοτινυλιωμένων ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αναγνωρίζουν ειδικές περιοχές αλληλουχιών βάσεων στο υπό εξέταση τμήμα DNA ή RNA και στόχος τους είναι η δέσμευση της επιθυμητής αλληλουχίας στο DNA/RNA υβρίδιο και η ακινητοποίησή του. Το εκπεμπόμενο σήμα των ιχνηθετών ανιχνεύεται με χημειοφωταύγεια. Κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ανίχνευση ακόμη και μεταλλαγμένων μορφών του ιού HPV. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι υψηλή με τη μείωση του μη-ειδικού υβριδισμού, χρησιμοποιώντας νουκλεοτίδια-αναστολείς, αλλά παραμένει σε πειραματικό στάδιο (159).

Υβριδοποίηση και ανίχνευση ενδοκυττάριου mRNA με κυτταρομετρία ροής

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της υπερέκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 των ογκογόνων τύπων του HPV. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ανάλυση των κυττάρων σε μικροσκοπικό επίπεδο με τη χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών υπολογίζοντας τη σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στα κύτταρα, και την παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία, καθώς τα κύτταρα διέρχονται από την κυψελίδα ροής με τη βοήθεια της υδροδυναμικής εστίασης. Βασίζεται σε σημασμένο μίγμα HPV ιχνηθετών τα οποία μονιμοποιούνται και γίνονται διαπερατά με τη χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (HPV OncoTect™, Invirion Diagnostics, LLC, Oak Brook, IL). Ακολουθεί η ανάλυσή τους σε κυτταρόμετρο ροής PartecCyFlow SL ή οποιοδήποτε άλλο ροόμετρο που διαθέτει 488nm argon laser ως πηγή φωτός και κατάλληλο φωτο-πολλαπλασιαστή. Όταν το ποσοστό των φθορίζοντων κυττάρων υπερβαίνει το 1.5% το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό. Η ευαισθησία της μεθόδου ανέρχεται στο 83.3% και η ειδικότητα στο 91.3% σε

πληθυσμούς με υψηλόβαθμη τραχηλική ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (89, 148, 149, 160).

Τεχνικές βασισμένες στην ενίσχυση Νουκλεϊκών Οξέων

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Απαραίτητη προϋπόθεση εφαρμογής της τεχνικής αυτής είναι η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός τμήματος του γονιδίου στόχου. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει αρχικά την αποδιάταξη μέσω επίδρασης θερμότητας του δίκλωνου DNA στόχου, στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται και οι εκκινητές επάγουν την αναδιάταξη του DNA. Τέλος, γίνεται η επιμήκυνση του εκκινητή με τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για 30-40 κύκλους με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της ποσότητας του DNA.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι δύο ειδών: α) οι γενικοί εκκινητές (consensus / general primers) με τους οποίους ανιχνεύεται η παρουσία του ιικού DNA και αφορούν την L1 δομική πρωτεΐνη του ιού και β) οι ειδικοί εκκινητές (specific primers) με τους οποίους γίνεται ανίχνευση των συγκεκριμένων HPV τύπων (149, 161-163).

Multiplex PCR

Στόχος της μεθόδου αυτής είναι η ταυτόχρονη ανίχνευση περισσότερων του ενός τύπων HPV με τη χρήση πολλών ζευγών εκκινητών σε μία μόνο αντίδραση. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι όλα τα ζεύγη των εκκινητών να μπορούν να συνδεθούν στο DNA στόχο κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη τεχνική υπάρχει η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης και τυποποίησης των εξής HPV τύπων: α) 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52 & 58 και β) 6, 11, 16, 18, 33.

In situ PCR

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την ανίχνευση του ενδοκυτταρικού ιικού γονιδιώματος διατηρώντας το κύτταρο ανέπαφο. Η τεχνική μπορεί να εμπλουτιστεί με τη χρήση RNA ανιχνευτών για τη μελέτη έκφρασης των ιικών γονιδίων και τον

εντοπισμό τους μέσα στο κύτταρο. Η μέθοδος φαίνεται να εμφανίζει περιορισμούς αφού απαιτεί ειδικούς κυκλοποιητές και συγκεκριμένες συνθήκες για τον περιορισμό της δράσης των πρωτεασών στο κύτταρο στόχο (149).

Real Time PCR

Η ποσοτική PCR ή αλλιώς γνωστή ως PCR πραγματικού χρόνου (quantitative PCR, Real-time PCR) έχει ως στόχο την ανίχνευση του HPV DNA, την τυποποίηση του ιού, το ιικό φορτίο, την ύπαρξη μεταλλάξεων και τη διάκριση της ενσωματωμένης από την επισωματική κατάσταση του ιικού DNA. Η q-PCR βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μιας φθορίζουσας ουσίας, το σήμα της οποίας αυξάνεται ανάλογα με το ποσό του PCR προϊόντος. Η μέθοδος επιτρέπει τη συνεχόμενη παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο και τη μαθηματική ανάλυση των δεδομένων πριν από το πέρας της μεθόδου. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων και είναι ταχεία και ακριβής (149, 164, 165).

Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων βασισμένη στην αλληλουχία (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA)

Πρόκειται για μοριακή μέθοδο ανάλυσης δειγμάτων η οποία διαφέρει από την PCR σε τρία κύρια σημεία: α) χρησιμοποιείται RNA αντί για DNA ή cDNA, β) η αντίδραση πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία στους 41°C χωρίς αυξομειώσεις σε αντίθεση με την PCR και γ) ο κίνδυνος επιμόλυνσης του δείγματος ελαχιστοποιείται καθώς οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε τρία κλειστά σωληνάκια.

Στην αρχή, προστίθεται το RNA ως εκμαγείο, σε κατάλληλο σωληνάριο με τα απαραίτητα ένζυμα της αντίδρασης και γίνεται η χρήση κατάλληλου εκκινητή (P1), ο οποίος προσδέεται στο συμπληρωματικό του σημείο, στο 3' άκρο του εκμαγείου. Ο εκκινητής αυτός διαθέτει αλληλουχία πρόσδεσης της T7 RNA πολυμεράσης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αντίστροφη μεταγραφή με τη χρήση της AMV-RT (Αντίστροφη Μεταγραφάση του βόειου ιού της Μυελοβλάστωσης) και συντίθεται η αντίθετη και συμπληρωματική αλυσίδα DNA. Στο υβρίδιο RNA-DNA που προκύπτει γίνεται υδρόλυση του RNA με τη δράση της RNase-H. Στη διαδικασία αυτή δεν υδρολύεται το μονόκλωνο RNA. Ακολουθεί η ενεργοποίηση του δεύτερου εκκινητή

(P2), ο οποίος προσκολλάται στο 5' άκρο της DNA αλυσίδας. Έτσι παράγεται με τη βοήθεια της T7 RNA πολυμεράσης μία συμπληρωματική RNA αλυσίδα, μετάγραφο του αρχικού στόχου, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πάλι κυκλικά επανακινώντας τη διαδικασία από την αρχή (166).

Το εμπορικό kit που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το Nucli SENSEasyQ[®] HPV v1.0 kit για τον ποιοτικό προσδιορισμό των E6/E7 mRNA των γονοτύπων HPV. Οι τύποι υψηλού κινδύνου που ανιχνεύονται είναι 16, 18, 31, 33 και 45. Τα δείγματα συγκεντρώνονται σε PreservCyt/Thinprep διάλυμα και προστίθεται στο NucliSENS[®] διάλυμα λύσης. Το διάλυμα αυτό περιέχει θειοκυανική γουανιδίνη και Triton X-100 και έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση νουκλεϊκών οξέων. Στο προϊόν της κυτταρόλυσης προστίθεται το μαγνητικό πυρίτιο ως μέσο απομόνωσης και τα νουκλεϊκά οξέα που είναι παρόντα στο NucliSENS[®] διάλυμα λύσης θα προσδεθούν στα μαγνητικά σωμάτια πυριτικού διοξειδίου υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (167, 168). Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος έκλουσης και τα νουκλεϊκά οξέα εκλούνται από τη στερεά φάση. Επίσης, το NucliSENS EasyQ[®] HPV v1.0 χρησιμοποιεί διάφορους εκκινητές για την ανίχνευση πολλαπλών RNA-στόχων: HPV 16, 18, 31, 33, 45 και U1A καθώς και molecular beacons ειδικά για κάθε στόχο. Πρόκειται για μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια-ιχνηθέτες με συμπληρωματικά άκρα που σχηματίζουν βρόχο και φθορίζουν μετά τον υβριδισμό με το στόχο τους. Στο ένα άκρο ο σχηματιζόμενος βρόχος συνδέεται με μία φθορίζουσα χρωστική και στο άλλο με ένα δεύτερο μόριο που απορροφά το φθορισμό της χρωστικής (quencher) αυτής (169, 170). Η ανάλυση των δεδομένων γίνεται σε πραγματικό χρόνο, το εκπεμπόμενο σήμα ανιχνεύεται από ειδικό μηχάνημα και η επεξεργασία γίνεται με ειδικό ηλεκτρονικό λογισμικό (171).

Καθορισμός αλληλουχίας του DNA με διδεδοξινουκλεοτίδια (Sequencing)

Πρόκειται για μέθοδο η οποία βασίζεται στην *in vitro* ενζυμική σύνθεση DNA παρουσία διδεδοξινουκλεοτιδίων (Sanger Dideoxy Sequencing) τα οποία σταματούν την επέκταση της DNA αλυσίδας.

Το DNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο μπορεί να είναι είτε μονόκλινο είτε δίκλινο. Στη δεύτερη περίπτωση θα πρέπει να προηγηθεί της αντίδρασης η αποδιάταξή του, είτε με τη χρήση θερμότητας, είτε με τη χρήση NaOH. Το

μονόκλωνο DNA δημιουργεί ένα υβρίδιο με έναν συμπληρωματικό εκκινητή, οποίος επεκτείνεται από μια DNA πολυμεράση (Klenow κλάσμα της DNA πολυμεράσης I ή μια τροποποιημένη μορφή της DNA πολυμεράσης του βακτηριοφάγου T7, “sequenase”).

Χρησιμοποιούνται τέσσερα δοκιμαστικά σωληνάρια (A, C, G, ή T) καθένα από τα οποία περιέχει τα κανονικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), τα σημασμένα (^{32}P , ^{32}S ή φθορίζων Cy5) και σε χαμηλή συγκέντρωση το αντίστοιχο διδεοξυνουκλεοτίδιο όπως τα τριφωσφορικά 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια της αδενίνης (ddATP), της κυτοσίνης (ddCTP), της γουανίνης (ddGTP) και της θυμίνης (ddTTP).

Η αντίδραση που πραγματοποιείται καθιστά αδύνατη την συνέχιση της 5'→3' επέκτασης της DNA αλυσίδας μετά από το σημείο ενσωμάτωσής τους λόγω της έλλειψης της 3' υδροξυλικής ομάδας στην δεοξυριβόζη των αναλόγων αυτών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα σε κάθε σωληνάριο να συσσωρεύεται ένα μείγμα κλώνων με μήκος που καθορίζεται από την αλληλουχία του DNA εκμαγείου. Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε υψηλή τάση σε γειτονικές στήλες ενός ειδικού λεπτού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης, το οποίο θερμαίνεται πάνω από τους 60°C ώστε να αναστέλλεται η επανασύνδεση των τμημάτων DNA. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας στο μόριο του DNA πραγματοποιείται από την σειρά των ζωνών πάνω στο πήκτωμα είτε με αυτοραδιογραφία είτε με τη χρήση Laser.

Η μέθοδος θεωρείται σημαντικά αξιόπιστη για την επιβεβαίωση μονών μολύνσεων από τον HPV και για την ανίχνευση γονοτύπων του HPV, οι οποίοι έχουν προσδιοριστεί με ειδικούς για το στέλεχος εκκινητές. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η παρουσία πολλαπλών τύπων του ιού, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία πολλαπλών κορυφών στο χρωματογράφημα ή αυτοραδιογράφημα, με συνέπεια την αδυναμία τυποποίησης (149, 172).

Τεχνικές βασιζόμενες στον συνδυασμό της PCR με Υβριδισμό

PCR-Elisa

Στην τεχνική αυτή μετά την απομόνωση του DNA στόχου ακολουθεί πολυμερισμός του με χρήση ειδικών γενικών εκκινητών της L1 περιοχής του HPV. Στη συνέχεια γίνεται η χρήση δύο ιχνηθετών και υβριδισμός του. Οι ιχνηθέτες αυτοί είναι συμπληρωματικοί με ειδικές αλληλουχίες του πολυμερισμένου προϊόντος. Οι εκκινητές MY09/11, μπορούν να ανιχνεύσουν έως και 27 HPV γονοτύπους (6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 66, 69 και 70) ενώ αν χρησιμοποιηθούν ειδικοί ιχνηθέτες μπορεί να πραγματοποιηθεί και τυποποίηση του HPV (149, 173).

Line blot hybridization & Reverse Line blot hybridization (Roche Molecular Diagnostics)

Χρησιμοποιούνται ειδικοί DNA ιχνηθέτες, οι οποίοι είναι ακινητοποιημένοι σε συγκεκριμένη θέση και σε γραμμική διάταξη πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Πάνω στις θέσεις αυτές υβριδοποιείται ένα πολυμερισμένο με PCR DNA και έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του ιού. Η παρουσία του πολυμερισμένου DNA στο υβρίδιο ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός συμπλόκου αλκαλικής φωσφατάσης - στρεπταβιοτίνης. Η αλκαλική φωσφατάση καταλύει τη δημιουργία χρώματος μετά από προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος με αποτέλεσμα να εμφανίζονται χρωματιστές «γραμμές» στις θέσεις όπου το πολυμερισμένο τμήμα έχει υβριδιστεί με το συγκεκριμένο ιχνηθέτη και με βάση τη θέση της χρωματιστής γραμμής πάνω στη ταινία να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του αντίστοιχου HPV τύπου (162, 173, 174).

Amplicolor HPV Test (Roche Molecular Diagnostics)

Το AMPLICOR HPV test χρησιμοποιεί την ενίσχυση του DNA στόχου με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και τον υβριδισμό νουκλεϊκού οξέος για την ανίχνευση των γονοτύπων υψηλού κινδύνου 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68 του (HR) HPV DNA σε κύτταρα του τραχήλου που συλλέγονται σε Thin Prep. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί βιοτινιλωμένους εκκινητές οι οποίοι

μπορούν να εντοπίσουν μία περιοχή μήκους 165 bp της L1 πρωτεΐνης του HPV γονιδιώματος. Η ανίχνευση του DNA-στόχου επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών για τον HPV συμπληρωματικών εκκινητών, τον υβριδισμό των ενισχυμένων προϊόντων σε ολιγονουκλεοτιδικούς ιχνηθέτες και την ανίχνευση των δεσμευμένων στον ιχνηθέτη ενισχυμένων προϊόντων με χρωματομετρικό προσδιορισμό.

Ειδικότερα, οι αλληλουχίες του ιχνηθέτη δέσμευσης βρίσκονται σε πολυμορφικές περιοχές της L1 που δεσμεύονται από αυτούς τους εκκινητές. Ένας επιπλέον εκκινητής στοχεύει το ανθρώπινο γονίδιο της β-σφαιρίνης (268 bp) ως ορός ελέγχου για την κυτταρική επάρκεια, την εκχύλιση και την ενίσχυση.

Αρχικά, πραγματοποιείται απομόνωση τόσο του κυτταρικού όσο και του ιικού DNA με επίδραση θερμότητας και παρουσία της πρωτεΐνάσης K ενώ στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του απελευθερωμένου νουκλεϊκού οξέος σε μια στήλη και έκπλυση με αντιδραστήριο έκπλυσης. Στη συνέχεια γίνεται ενίσχυση PCR κατά την οποία η AmpliTaq®Gold DNA πολυμεράση χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του HPV DNA στόχου καθώς και του ορού ελέγχου της β-σφαιρίνης με τη μέθοδο “hot start”. Με τη χρήση της πολυμεράσης ακολουθεί αποδιάταξη του ιικού DNA και του DNA του γενώματος με την επίδραση θερμότητας και καθώς το μίγμα ψύχεται, οι εκκινητές υβριδίζονται στις αλληλουχίες DNA στόχου. Η AmpliTaq®Gold DNA πολυμεράση με την παρουσία του Mg^{2+} και πλεονάσματος dNTPs, επεκτείνει τους εκκινητές και συντίθεται ένας δεύτερος κλώνος DNA.

Αυτό ολοκληρώνει τον πρώτο κύκλο της PCR, με τη δημιουργία ενός δίκλωνου αντιγράφου DNA της περιοχής-στόχου του γονιδιώματος HPV και του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Η AmpliTaq®Gold DNA πολυμεράση επεκτείνει τους υβριδισμένους εκκινητές κατά μήκος των προτύπων-στόχων για τη δημιουργία ενός μορίου δίκλωνου DNA του HPV στόχου περίπου 165 ζευγών βάσεων ή ενός μορίου DNA β-σφαιρίνης που ονομάζεται κλώνος (amplicon).

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για έναν αριθμό κύκλων, σε καθέναν από τους οποίους διπλασιάζεται ο αριθμός των DNA κλώνων. Η ενίσχυση πραγματοποιείται μόνο στη περιοχή του γονιδιώματος HPV ή του γονιδίου β-σφαιρίνης μεταξύ του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών. Δεν ενισχύεται ολόκληρο το γονιδίωμα.

Στη συνέχεια ακολουθεί η επιλεκτική ενίσχυση με τη χρήση του ενζύμου AmpErase (ουρακίλη N-γλυκοζυλάση) και της τριφωσφορικής δεοξουριδίνης (dUTP). Το

ένζυμο AmpErase αναγνωρίζει και καταλύει τη διάσπαση των κλώνων του DNA που περιέχουν δεοξουριδίνη αλλά όχι του DNA που περιέχει δεοξυθυμιδίνη. Η δεοξουριδίνη δεν υπάρχει στο φυσικό DNA, αλλά υπάρχει πάντοτε στον κλώνο λόγω της χρήσης τριφωσφορικής δεοξουριδίνης, αντί της τριφωσφορικής θυμιδίνης. Ακολουθεί η αντίδραση υβριδισμού, κατά τον οποία ο κλώνος (amplicon) HPV και ο κλώνος της β-σφαιρίνης υπόκεινται χημική αποδιάταξη για το σχηματισμό μονόκλωνου DNA με την προσθήκη διαλύματος αποδιάταξης. Τα κλάσματα του κλώνου προστίθενται σε ξεχωριστά πλακίδια μικροβυθισμάτων (MWP) στα οποία υπάρχει επικάλυψη είτε ιχνηθετών HPV υψηλού κινδύνου ή ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών ειδικών για τη β-σφαιρίνη (B-PCO3). Το επισημασμένο με βιοτίνη HPV και ο κλώνος της β-σφαιρίνης υβριδίζονται στους ολιγονουκλεοτιδικούς ιχνηθέτες που είναι δεσμευμένοι στα βυθίσματα του MWP. Γίνεται προσθήκη του συζευκτικού avidin-υπεροξειδάσης ραφανίδας ο οποίος συνδέεται στον επισημασμένο με βιοτίνη κλώνο και ακολουθεί προσθήκη διαλύματος υποστρώματος που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου και 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB). Με την παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η δεσμευμένη υπεροξειδάση ραφανίδας καταλύει την οξείδωση της TMB με σχηματισμό ενός έγχρωμου συμπλόκου. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη ενός ασθενούς οξέος και η απορρόφηση στα 450 nm μετράται με τη χρήση αυτοματοποιημένης συσκευής ανάγνωσης πλάκας μικροβυθισμάτων (149, 175-177).

HPV DNA Μικροσυστοιχίες (CLART® Human Papillomavirus 2 kit, GENOMICA)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ανάπτυξη ενός συστήματος ανίχνευσης HPV ολιγονουκλεοτιδίων, το οποίο βασίζεται σε μία υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας PCR και στη τεχνολογία των μικροσυστοιχιών μικρής πυκνότητας (CLART-Clinical Array Technology): σωληνάριο ArrayTube™. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και τυποποίηση 35 διαφορετικών γονοτύπων του HPV(6, 11,16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 και 89) μέσω PCR ενός τμήματος της υψηλά συντηρημένης L1 περιοχής του ιού. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιεί βιοτινιλιωμένους εκκινητές μιας περιοχής της L1 πρωτεΐνης, μεγέθους 450bp, για τον πολυμερισμό του απομονωμένου DNA.

Το DNA του HPV απομονώνεται από υλικό κυτταρολογίας υγρής φάσης (ThinPrep[®], Cytoc). Ακολουθεί φυγοκέντρηση του ιζήματος με την προσθήκη πρωτεΐνάσης K και το DNA κατακρημνίζεται με τη χρήση αιθανόλης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε στήλη καθαρισμού και μετά από μερικές εκπλύσεις το DNA εκλούεται. Αυτό το διάλυμα χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την ενίσχυση με PCR ενός τμήματος της L1 περιοχής.

Τα προϊόντα της PCR συνδέονται με βιοτίνη κατά την αντίδραση PCR και υβριδοποιούνται με τους ειδικούς ιχνηθέτες τους οι οποίοι είναι προσδεμένοι στην επιφάνεια μικροσυστοιχιών με αποτέλεσμα να ακινητοποιούνται στην επιφάνεια αυτή. Το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-περοξειδάσης θα αναγνωρίσει τα προϊόντα της PCR, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα να δράσει η περοξειδάση στο υβριδοποιημένο προϊόν, να μεταβολίσει την ο-Διανισίνη και να παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν που θα κατακρημνιστεί στις θέσεις υβριδοποίησης επιτρέποντας την οπτικοποίησή τους. Η διαγνωστική ευαισθησία της τεχνικής ανέρχεται στο 99% και η ειδικότητά της στο 100% (178-180).

INNO-LiPA HPV detection and genotyping

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται: α) η ενίσχυση του HPV DNA, με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η εξαγωγή του DNA γίνεται με τη μέθοδο QIAamp DNA και η ενίσχυση επιτυγχάνεται με το INNO-LiPA HPV detection/genotyping assay (SPF 10 system, version 1; Labo Biomedical Products bv, Rijswijk, The Netherlands). Στόχος αποτελεί μια περιοχή μήκους 65 bp της L1 πρωτεΐνης και επιτρέπει την ανίχνευση και τυποποίηση 43 τύπων του HPV. β) η τυποποίηση των γονοτύπων του HPV με την τεχνική του ανάστροφου υβριδισμού. Ειδικότερα, όταν το poly(dT) προστεθεί στο 3' άκρο καθενός από τα 25 ολιγονουκλεοτίδια τα οποία είναι ειδικά για κάθε ένα από τους 25 τύπους του HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68/73, 70, 74), τα ολιγονουκλεοτίδια υβριδισμού εμφανίζονται σε γραμμική διάταξη σε strips (Labo Biomedical Products bv, Rijswijk, The Netherlands). Στη συνέχεια τα strips υφίστανται επεξεργασία με το συζευκτική αλκαλική φωσφατάση-στρεπταβιδίνη στους 25°C για μισή ώρα και η χρώση εμφανίζεται με την προσθήκη της 5-βρωμο-4-

χλωρο-3-ινδολιφωσφατάση και τετραζόλιο σε 1 ml του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) (175).

ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ

Η κολποσκόπηση αποτελεί διαγνωστική μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται για την εξέταση του κατώτερου γυναικολογικού συστήματος και του αιδοίου βασιζόμενη στο φωτισμό και τη μεγέθυνση.

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1925 από τον Hinselmann και στοχεύει στην αξιολόγηση προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας στην περίπτωση παθολογικού επιχρίσματος ή όταν υπάρχει κλινική υποψία κακοήθειας. Στην περίπτωση παθολογικής κυτταρολογικής διάγνωσης, σκοπός της κολποσκοπικής εξέτασης είναι να επιβεβαιώσει ή να απορρίψει το κυτταρολογικό εύρημα, να διαγνώσει ή να αποκλείσει την περίπτωση διήθησης, να ανιχνεύσει την παρουσία ή μη αδενικής νόσου, να καθορίσει την ακριβή γεωγραφική ή ανατομική θέση της Ζώνης Μετασχηματισμού, να εντοπίσει την εξέλιξη ή την υποστροφή της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης και τέλος, να διευκολύνει την απόφαση περαιτέρω διαχείρισης καθορίζοντας το τύπο και την έκταση της θεραπείας αλλά και την μετεγχειρητική παρακολούθηση (181-183).

Το κολποσκόπιο είναι ένα διόφθαλμο μηχάνημα το οποίο επιτρέπει τη μεγέθυνση και το φωτισμό του τραχήλου. Η μεγέθυνση που επιτυγχάνεται είναι της τάξεως 6- και 40-fold. Η εφαρμογή μεγάλης μεγέθυνσης έως 40-fold και η χρήση του πράσινου φίλτρου μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω ευκρίνεια της αγγείωσης του τραχήλου. Σε χαμηλή μεγέθυνση, έως 20 fold, εξετάζεται ο τράχηλος και το ανώτερο τμήμα του κόλπου. Το οξικό οξύ (διάλυμα περιεκτικότητας 3 - 5%), εφαρμόζεται με βαμβακοφόρο στυλεό και παραμένει σε επαφή για 10 sec. Διάλυμα Lugol's iodine 1% μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αναγνώριση του άτυπου επιθηλίου, το οποίο δεν περιέχει γλυκογόνο και συνεπώς δεν απορροφά την ιωδίνη, 'Schiller's test'. Στην περίπτωση μη απορρόφησης της ιωδίνης, η αντίδραση αυτή χαρακτηρίζεται ως θετική (46, 184).

ΕΙΔΗ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ

Άτυπα κύτταρα του πλακώδους επιθηλίου αδιευκρίνιστης σημασίας - Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASCUS)

Με το σύστημα Bethesda 1991, έγινε εμφανής λόγω της υποκειμενικής φύσης της κυτταρολογίας, η αναγκαιότητα εισαγωγής μια ενδιάμεσης κατηγορίας η οποία θα διευκόλυνε την κυτταρολογική διάγνωση (185-188). Η κατηγορία αυτή ονομάστηκε Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASCUS). Η αναθεώρηση του συστήματος Bethesda το 2001 οδήγησε στη δημιουργία δύο υποκατηγοριών (135). Η πρώτη κατηγορία αναφέρεται σε δείγματα με χαμηλό κίνδυνο παρουσίας CIN2,3 και ονομάζεται ASC-US. Η δεύτερη κατηγορία είναι λιγότερο συχνή και συσχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο παρουσίας CIN2,3. Αυτή η κατηγορία ονομάζεται άτυπα πλακώδη κύτταρα χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (Atypical Squamous Cells; cannot exclude High-grade squamous intraepithelial lesion) (ASC-H), και ο όρος αυτός χρησιμοποιείται όταν δεν υπάρχουν όλα τα κυτταρολογικά ευρήματα που συνηγορούν υπέρ υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (HgSIL) (135, 137, 189).

Μια σημαντική παρατήρηση για τους κλινικούς ιατρούς είναι η μικρή αναπαραγωγιμότητα του ASCUS (190-192). Αναφορικά, η *National Cancer Institute's ASC-US-LSIL Triage Study (ATLS)*, έδειξε ότι μόνο το 55% τελικά των κυτταρολογικών δειγμάτων θεωρήθηκαν ASCUS, με το 31% των περιπτώσεων μετά από ποιοτικό έλεγχο, να υποβαθμίζονται σε φυσιολογικά δείγματα και το 14% να αναβαθμίζονται σε χαμηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (189, 193).

Η κυτταρολογική διάγνωση ASC-US αναφέρεται σε ένα μεγάλο ποσοστό (>90%) των επιχρισμάτων τα οποία φέρουν μορφολογικούς χαρακτήρες χαμηλόβαθμης αλλοίωσης αλλά είναι ποιοτικά και ποσοτικά ανεπαρκή δείγματα για να υποστηρίξουν τη διάγνωση αυτή. Οι κυτταρικές αλλαγές συνίστανται σε διπλασιασμό ή και τριπλασιασμό του μεγέθους του πυρήνα, μικρή αύξηση της αναλογίας πυρήνα/κυτταροπλάσματος και μόνο ελαφρά πυρηνική υπέρχρωση.

Τα ASC-H δείγματα αποτελούν μόνο το 5% των άτυπων κυτταρολογικών επιχρισμάτων εμφανίζοντας μη επαρκή ποιοτικά και ποσοτικά στοιχεία για να υποστηρίξουν τη διάγνωση υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης. Τα κύτταρα

έχουν συνήθως το μέγεθος των μεταπλαστικών κυττάρων και μπορεί να εμφανίζονται μεμονωμένα ή να συγκροτούνται σε ομάδες. Ο πυρήνας είναι 1.5-2 φορές διογκωμένος με ήπιες αλλοιώσεις. Η κλινική σημασία των κυτταρολογικών αυτών δειγμάτων έγκειται στο γεγονός ότι μια γυναίκα με κυτταρολογία ASCUS σε έλεγχο ρουτίνας, έχει 5% με 16% πιθανότητα να έχει βιοψία που να επιβεβαιώνει CIN2,3. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 20 μελέτες, έδειξε ότι η επίπτωση CIN2,3 σε πληθυσμό με ASCUS ήταν 9.7% (194). Στις περισσότερες μελέτες περίπου 50% των γυναικών με ASC-H θα έχουν βιοψία που θα επιβεβαιώσει υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση CIN 2/3.

Χαμηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις - Low grade Squamous Intraepithelial Lesions (LgSIL)

Κυτταρικά επιχρίσματα με χαμηλού βαθμού κυτταρολογικές αλλοιώσεις (LgSIL) παρατηρούνται κυρίως σε γυναίκες νεαρής ηλικίας (16-26 ετών) και μάλιστα σε ποσοστό 22-24% στην ηλικία των 20 ετών, ή στην αρχή της σεξουαλικής ζωής, με τάση υποστροφής σε γυναίκες άνω των 30 ετών (44, 60, 69, 195, 196). Η Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ATLS) μελέτη έδειξε ότι 87% των γυναικών κάτω των 29 ετών με LgSIL, ήταν θετικές για HR-HPV τύπους συγκριτικά με μεγαλύτερη ηλικιακά ομάδα (75%) (197). Σε αντίθεση με τα HgSIL κυτταρικά επιχρίσματα, όπου η πλειοψηφία των γυναικών έχει επιμολυνθεί με έναν HPV τύπο, η μελέτη ALTS έδειξε ότι στο 58.9% των γυναικών με LgSIL ανιχνεύθηκαν περισσότεροι του ενός HPV υπότυποι (198).

Η κυτταρολογική διάγνωση του LgSIL βασίζεται στην ανίχνευση ανώμαλων πλακωδών κυττάρων των οποίων το μέγεθος είναι ίδιο με αυτό των φυσιολογικών κυττάρων της επιφανειακής ή ενδιάμεσης στιβάδας. Η διάγνωση βασίζεται στην παρουσία ευμεγέθους κυτταρικού πυρήνα, τουλάχιστον τριπλάσιο του φυσιολογικού, και την ανομοιογένεια της πυρηνικής μεμβράνης και της κατανομής της χρωματίνης. Επιπρόσθετα στοιχεία αποτελούν η παρουσία υπερχρωματικού πυρήνα και κολλοκυττάρωσης.

Ωστόσο, τα κύρια διαγνωστικά ευρήματα είναι η παρουσία πυρηνικής μεγέθυνσης και ατυπίας. Το ποσοστό των γυναικών που εμφανίζει υποστροφή μιας LgSIL

αλλοίωσης δεν έχει πλήρως τεκμηριωθεί. Φαίνεται, ότι σε νεαρές γυναίκες είναι συχνότερη η εμφάνιση υποστροφής της LgSIL αλλοίωσης και μόνο σε ένα μικρό ποσοστό αυτών θα παρατηρηθεί εξέλιξη σε υψηλόβαθμη αλλοίωση. Περίπου 28% των γυναικών με κυτταρολογία LgSIL θα έχουν ιστολογικά επιβεβαιωμένη CIN2/3 αλλοίωση (58). Ο Melnikow et al σε μετα-ανάλυση που πραγματοποίησε το 1998, έδειξε ότι το 53% των δειγμάτων με LgSIL εμφάνισαν υποστρόφη σε διάστημα 2 ετών, το 20.81% εξελίχθηκαν σε CIN2,3 και το 0.1-0.2% των δειγμάτων σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (195).

Υψηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις - High grade Squamous Intraepithelial Lesions (HgSIL)

Βασιζόμενοι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, κυτταρολογία HgSIL φαίνεται να αντιστοιχεί μόνο σε ποσοστό μεταξύ του 0.5% και 1.5% όλων των κυτταρολογικών επιχρισμάτων, με μεγαλύτερη επίπτωση σε γυναίκες ηλικίας 25-29 ετών (199, 200). Επιπλέον, στο ηλικιακό αυτό φάσμα φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πιθανότητα εμφάνισης CIN2,3 αλλοίωσης σε ποσοστό 70-75% ενώ το ποσοστό εμφάνισης διηθητικού καρκίνου ανέρχεται στο 1-4% του ίδιου πληθυσμού (Πίνακας 3) (201, 202). Επίσης, από την δημοσίευση του Östör το 1993 (Πίνακας 4), προκύπτει ότι το 33-40% των γυναικών με HgSIL κυτταρολογία θα υποστρέψει, και από τις μελέτες των Ho και Discacciati το 2011, ότι το 52% των CIN2 θα υποστρέψουν σε χρονικό διάστημα 12 μηνών, ενώ περίπου το 74% των CIN2 θα υποστρέψουν κάποια στιγμή στο μέλλον (57, 203, 204).

Πίνακας 3: Συσχέτιση μεταξύ κυτταρολογίας και ιστολογικής διάγνωσης

	CIN2,3	Καρκίνος
ASC-US	5-16%	0.1%
ASC-H	20-50%	3%
LSIL	20.8- 28%	0.15%
HSIL+	70-75%	1-4%

Πίνακας 4: Πιθανότητα έκβασης των CIN σε χρονικό διάστημα 12 μηνών (57)

Severity of the Lesion	Regression	Persistence	Progression to CIN3	Progression to invasive cancer
CIN 1	60%	40%	10%	1%
CIN 2	40%	40%	20%	5%
CIN 3	33%	<55%	-	>12%

Σχετικά με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, αυτά αφορούν την απώλεια διαφοροποίησης, τη σημαντική πυρηνική ατυπία και την ελάττωση του κυτταροπλάσματος. Το μέγεθος των κυττάρων είναι μικρότερο από τα φυσιολογικά βασικά ή παραβασικά κύτταρα. Συγκρινόμενα με τις χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις, τα κυτταρολογικά δείγματα των HgSIL αλλοιώσεων εμφανίζουν σημαντική αύξηση στην αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος και έλλειψη κοιλοκυττάρωσης. Οι πυρήνες των κυττάρων χαρακτηρίζονται από υπέρχρωση και την απουσία των νουκλεοτιδίων. Τα κύτταρα μπορεί να είναι μεμονωμένα ή να εμφανίζονται σε ομάδες. Σημαντική σύγχυση στην κυτταρολογική διάγνωση μπορεί να προκύψει στην περίπτωση των εμμηνοπαυσιακών γυναικών, όπου υπάρχει η αυξημένη αναλογία πυρήνα/κυτταροπλάσματος και η ατυπία λόγω κυτταρικής ατροφίας.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Σύμφωνα με τις διεθνείς συστάσεις, η κυτταρολογική λήψη επιχρίσματος ανά 3-5 έτη στα πλαίσια εφαρμογής οργανωμένων προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου (population-based), είναι ένα μεσοδιάστημα πλήρως αποδεκτό χωρίς την ανάγκη επαναπροσδιορισμού (205). Δεδομένου ότι το χρονικό μεσοδιάστημα μεταξύ της προκαρκινικής αλλοίωσης και της ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας είναι κατά μέσο όρο 10-12 χρόνια, τα εναλλακτικά προτεινόμενα μεσοδιαστήματα μεταξύ των ελέγχων, δε φαίνεται να διαφοροποιούν την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων αυτών (205-208). Σύμφωνα με τις υπάρχουσες Ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες, η προτεινόμενη ηλικία έναρξης των ελέγχων κυμαίνεται μεταξύ 20 και 30 ετών και οι έλεγχοι λήγουν στην ηλικία των 60- 65 ετών.

Στις χώρες με ευκαιριακό έλεγχο και χωρίς οργανωμένα προγράμματα, η ετήσια κάλυψη του πληθυσμού αναφέρεται μεταξύ 30% και 50% (209, 210). Ενδεικτικά του μη οργανωμένου προγράμματος πληθυσμιακού ελέγχου είναι τα ποσοστά γυναικών στην Αυστρία (24% στις ηλικίες 20-69), στη Μάλτα (18-30% στις ομάδες 25-44 ετών και 45-64 ετών αντιστοίχως) και στο Βέλγιο (33%), οι οποίες δεν έχουν υποβληθεί σε Pap test. Επιπλέον, δεδομένα από άλλες μελέτες έδειξαν πως γυναίκες ανώτερου κοινωνικο-οικονομικού επιπέδου, έχουν συχνότερους επανελέγχους συγκριτικά με τα προτεινόμενα χρονικά μεσοδιαστήματα (211).

Η ψυχολογική φόρτιση των γυναικών που διαγιγνώσκονται με παθολογική κυτταρολογία, οι περιπτώσεις υπερθεραπείας με αύξηση του κινδύνου για μελλοντικό πρόωρο τοκετό, καθώς και η καθυστερημένη διάγνωση ψευδώς αρνητικών Pap test, συνιστούν ορισμένα από τα μειονεκτήματα των συστημάτων του πληθυσμιακού ελέγχου (208, 212-214).

Διαφαίνεται λοιπόν, ότι η εφαρμογή ενός προγράμματος που είναι οικονομικά αποδεκτό θα έπρεπε να βασίζεται στο Pap test σε συνδυασμό είτε με τυποποίηση του HPV, είτε με ανίχνευση της έκφρασης του mRNA των E6 και E7 ογκοπρωτεϊνών του HPV, ή στο συνδυασμό των μεθόδων αυτών συμπληρωματικά, ανάλογα με τα επιλεγόμενα μεσοδιαστήματα ελέγχου (158, 215-217). Ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η περιοδική γυναικολογική εξέταση των γυναικών σε συνδυασμό με Pap test, επιτυγχάνει τη μείωση κατά 70%

της θνησιμότητας από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (22, 218, 219). Ωστόσο, αποτελεί αναμφισβήτητο γεγονός, ότι τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα από τη χρήση του Pap test, έχουν αυξησει τόσο τον αριθμό των επισκέψεων όσο και το υπολογιζόμενο κόστος στο πλαίσιο προγραμμάτων προσυμπτωματικού ελέγχου (220).

Όσον αφορά τις συμπληρωματικές μεθόδους προ-συμπτωματικού ελέγχου, η ευαισθησία του HC2 για την ανίχνευση του HPV DNA υπολογίζεται ότι κυμαίνεται από 86% έως 100%, η ειδικότητα από 28% έως 86%, η θετική προγνωστική αξία από 28% έως 82% και η αρνητική προγνωστική αξία από 67% έως 100% (158, 221-223).

Προκειμένου για άλλες μοριακές μεθόδους (real-time PCR, Linear Array®, Roche Diagnostics, Amplicor®, Roche Diagnostics), τα αντίστοιχα στατιστικά δεδομένα είναι: ευαισθησία από 70% έως 96%, ειδικότητα 39% έως 92%, θετική προγνωστική αξία 30% έως 91% και αρνητική προγνωστική αξία από 56% έως 97%. Όσον αφορά, όμως, την εφαρμογή μοριακών μεθόδων ανίχνευσης του mRNA των E6/E7 του ιού, η ευαισθησία υπολογίζεται σε 41% έως 86%, η ειδικότητα σε 66% έως 97% και η θετική προγνωστική αξία σε ποσοστό από 50% έως 94% (177).

Νέα ώθηση στην οργάνωση προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου και τη λήψη κλινικών αποφάσεων έδωσαν αναπτυσσόμενα υπολογιστικά συστήματα (224). Πρόκειται για συμβουλευτικά συστήματα, τα οποία χρησιμοποιούν μαθηματικά εργαλεία προσομοίωσης, μεθόδους επεξεργασίας ιατρικών δεδομένων και μεθόδους τεχνητής νοημοσύνης για την κωδικοποίηση της διαθέσιμης γνώσης και για την επίλυση σύνθετων προβλημάτων που προκύπτουν στην κλινική πράξη. Αν και η ανάπτυξη των συστημάτων αυτών τα τελευταία χρόνια είναι ραγδαία, παραμένει το γεγονός πως η πλειοψηφία τους αφορά την ανάλυση βιοσημάτων ή ιατρικών εικόνων για ανίχνευση πληροφοριών με σκοπό την υποστήριξη διάγνωσης. Συστηματικές προσπάθειες επίτευξης συνδυασμού μοριακών και κλινικών δεδομένων προς τη κατεύθυνση ανάπτυξης ενός εξατομικευμένου συστήματος υπολογισμού αθροιστικού κινδύνου γίνονται τα τελευταία χρόνια από διάφορες ερευνητικές ομάδες (225-230). Τέλος, έχουν αναπτυχθεί ευαίσθητα εργαλεία αντικειμενικοποίησης της τραχηλικής κυτταρολογίας, τα οποία διέπονται από δια- και ενδο-παρατηρητή μεταβλητότητα (inter and intra observer variability)

βασίζόμενα στη χρήση της Attenuated Total Reflection Fourier-transform IR (ATR-FTIR) spectroscopy (231, 232).

HPV ΕΜΒΟΛΙΑ

Η διαδραστική σχέση του ιού HPV με τους ιστούς, το κύτταρο ξενιστή και κυρίως με το ανοσοποιητικό σύστημα, έχει αποτελέσει αντικείμενο συστηματικής μελέτης τα τελευταία χρόνια. Μέσα από τη διαδικασία αυτή, αναπτύχθηκε, όπως ήδη αναφέραμε παραπάνω, μια σειρά ευαίσθητων και ειδικών διαγνωστικών μοριακών μεθόδων σχετικών με την ανίχνευση και τυποποίηση του ιού, αλλά και η δημιουργία προφυλακτικών HPV εμβολίων ως το τελευταίο επιστημονικό επίτευγμα στην ιστορία της πρόληψης από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Οι υπάρχουσες μελέτες αποδεικνύουν ότι η ευρεία εφαρμογή του εμβολιασμού με την 100% εμβολιαστική κάλυψη όλων των θηλέων εφήβων πριν την εμμηναρχή, θα οδηγήσει σε μια μείωση της τάξης του 40% των LgSIL-CIN 1, 50-60% των HgSIL-CIN 2+ και 90% των Adeno-Carcinomas In Situ (AIS), σε χρονικό διάστημα μιας πενταετίας. Υπολογίζεται επίσης, ότι ο εμβολιασμός μακροπρόθεσμα θα οδηγήσει σε μια μείωση περίπου 70-80% των διηθητικών καρκίνων του τραχήλου της μήτρας (233). Ο HPV εμβολιασμός θα οδηγήσει σε αναπροσαρμογή των προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου, χωρίς να καταργήσει το ζωτικό ρόλο αυτών, καθώς η συνέργεια και η αλληλοεπικάλυψη πρωτογενούς και δευτερογενούς πρόληψης κρίνονται απαραίτητες ως τρόπος ουσιαστικής δράσης και αντιμετώπισης του προβλήματος για τις επόμενες δεκαετίες (234).

Τα εμβόλια που κυκλοφορούν στο εμπόριο σήμερα έχουν αναπτυχθεί βασιζόμενα στη χρήση των virus-like particles (VLPs) που αποτελούνται από την L1 πρωτεΐνη του ιού. Είναι ευρέως αποδεκτό και κλινικά αποδεδειγμένο σε πειραματόζωα, ότι τα συγκεκριμένα εμβόλια προστατεύουν, επιδρώντας στην ανοσιακή απάντηση του ανθρώπινου οργανισμού (234, 235). Η ορολογική απάντηση στο εμβόλιο φαίνεται να είναι κατά τέσσερις φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αναμενόμενη φυσική ανοσιακή απάντηση του οργανισμού στη λοίμωξη από τον ιό HPV, γεγονός που οφείλεται είτε στη χρήση ειδικών βοηθητικών ουσιών, είτε στην ισχυρή ανοσογενετικότητα των VLPs, είτε ακόμη και λόγω της οδού χορήγησης.

Η μεγαλύτερη έρευνα πάνω στο αντικείμενο των HPV εμβολίων που έχει λάβει χώρα μέχρι σήμερα επικεντρώνεται στα IgG αντισώματα, και ειδικότερα σε εκείνα που αυξάνονται ενάντια στις type-specific L1 πρωτεΐνες του ιικού καψιδίου. Τα L1

IgG που εμπεριέχονται στην τραχηλική βλέννη φαίνεται ότι στοχεύουν στην άμεση εξουδετέρωση του ιού. Στο γεγονός αυτό επικεντρώνεται και η αναγκαιότητα εμβολιασμού πριν την έναρξη των σεξουαλικών επαφών, αφού η αποτελεσματικότητα των L1 εμβολίων σε ενσωματωμένες HPV λοιμώξεις δεν είναι σαφώς αποδεδειγμένη.

Η προστασία που παρέχεται από τον εμβολιασμό παραμένει λειτουργική ακόμη και με μικρούς τίτλους αντισωμάτων έναντι του HPV. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι οι υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων που επιτυγχάνονται και από τα δυο σήμερα κυκλοφορούντα στο εμπόριο σκευάσματα (Gardasil™ - τετραδύναμο και διδύναμο - Cervarix™), μπορούν να εξασφαλίσουν παρατεταμένη προστασία ακόμη και μετά την πιθανή εξασθένηση του αρχικού τίτλου αντισωμάτων (235).

Επί του παρόντος, στην παγκόσμια αγορά κυκλοφορούν δύο HPV εμβόλια: α) το διδύναμο (Cervarix™), το οποίο περιέχει VLP αντιγόνα, για τους HPV τύπους 16 και 18 στην αναλογία των 20 μg για τον κάθε ένα υπότυπο, και β) το τετραδύναμο (Gardasil™) το οποίο εμπεριέχει VLP αντιγόνα για τους τύπους HPV 16 (40 μg) και HPV 18 (20 μg), καθώς επίσης και VLP αντιγόνα για τους μη ογκογόνους τύπους HPV 6 (20 μg) και HPV 11 (20 μg), οι οποίοι ευθύνονται για το 83% περίπου των κλινικών κονδυλωμάτων. Τα VLP αντιγόνα είναι συνδυασμένα με κάποιο ενισχυτικό: ASO4, σε άλας αλουμινίου στο Cervarix™ και θειϊκό υδροξυφωσφορικό αργίλιο στο Gardasil™. Και τα δύο εμβόλια χορηγούνται με συγκεκριμένο δοσολογικό σχήμα τριών ενδομυϊκών δόσεων (διδύναμο: 0, 1 και 6 μήνες και τετραδύναμο: 0, 2 και 6 μήνες αντίστοιχα).

Τα εν λόγω εμβόλια είναι εξίσου ασφαλή και επαρκώς ανεκτά από τον ανθρώπινο οργανισμό. Οι μοναδικές παρενέργειες που περιγράφονται είναι τοπικές αντιδράσεις όπως πόνος, πρήξιμο και ερυθρότητα στην περιοχή της χορήγησης, συνήθως μικρής διάρκειας. Οι συστηματικές παρενέργειες, οι οποίες αναφέρονται ως πολύ σπάνιες στη βιβλιογραφία, περιλαμβάνουν πυρεξία, ναυτία, καταβολή, πονοκέφαλο και μυαλγία (236-238).

Η αποτελεσματικότητα και των δύο εμβολίων όσον αφορά τη λοίμωξη από τους τύπους 16 και 18 του ιού, έχει υπολογιστεί έως 8.4 έτη με το διδύναμο (PATRICIA και the Costa Rica HPV vaccine trial) και έως 5 έτη με το τετραδύναμο (FUTURE I και FUTURE II trials). Υψηλή αποτελεσματικότητα επιτεύχθηκε με το διδύναμο εμβόλιο

(PATRICIA trial) έως 93.2% (95% CI: 78.9–98.7) έναντι των CIN3+ αλλοιώσεων σε Total Vaccinated Cohort (TVC)-naïve πληθυσμό ανεξαρτήτου HPV τύπου. Στην TVC ανάλυση, η αποτελεσματικότητα ήταν 45.6% (95% CI: 28.8–58.7) έναντι των CIN3+ αλλοιώσεων ανεξαρτήτως HPV υποτύπου. Επιπλέον, στην Costa Rica HPV vaccine trial η αποτελεσματικότητα ήταν 90.9% (95% CI:82.0–95.9) όσον αφορά την ετήσια εμμονή λοίμωξης από HPV 16/18 στην ATP (According To Protocol) cohort και 49.0% (95% CI: 38.1–58.1) στην Intention To Treat (ITT) ανάλυση. Όσο αφορά το GARDASIL η αποτελεσματικότητα ανεξαρτήτως του HPV τύπου φαίνεται να είναι 43.0% (95% CI: 13.0–63.2) έναντι των CIN3 αλλοιώσεων στον ITT-naïve πληθυσμό και 16.4% στην ITT ανάλυση (239-244).

Επιπλέον, μελέτες αποτελεσματικότητας σε HPV-naïve γυναίκες, που χορηγήθηκε το τετραδύναμο εμβόλιο φάνηκε να έχουν 83% προστασία έναντι των γενετικών κονδυλωμάτων και 100% έναντι αυτών που οφείλονται στον HPV 6 και 11 (245, 246).

Και τα δύο εμβόλια φαίνεται να παρουσιάζουν μια διασταυρούμενη προστασία έναντι σε HPV τύπους που δεν συμπεριλαμβάνονται σε αυτά και η οποία πιθανώς να εξηγείται από τις φυλογενετικές ομοιότητες μεταξύ των L1 γονιδίων των τύπων του εμβολίου καθώς και των τύπων που δεν συμπεριλαμβάνονται στα σκευάσματα. Ο HPV 16 είναι φυλογενετικά σχετιζόμενος με τους HPV τύπους 31, 33, 52 και 58 (A9 species) ενώ ο HPV 18 είναι σχετιζόμενος με τον υπότυπο HPV 45 (A7 species) (247, 248).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με τα σημερινά εμβόλια που καλύπτουν μόνο τους HPV ογκογόνους τύπους 16 και 18, υπολογίζεται ότι παρεχόμενη προστασία έναντι όλων των καρκίνων του πλακώδους επιθηλίου αγγίζει το ποσοστό της τάξης του 70%. Με σκοπό την αύξηση της προστασίας στο 90% έναντι όλων των καρκίνων του πλακώδους επιθηλίου παγκοσμίως, μελέτες οι οποίες αφορούν το τετραδύναμο εμβόλιο και την προσθήκη σε αυτό άλλων 5 HPV τύπων (31, 33, 45, 52 και 58), είναι ήδη σε εξέλιξη (249).

Παράλληλα, φαίνεται ότι υπάρχει αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον και συστηματική προσπάθεια προς την κατεύθυνση ανάπτυξης ενός 9-δύναμου HPV εμβολίου, την παρασκευή L2 εμβολίων καθώς και την ανάπτυξη HPV εμβολίων με θεραπευτικές ιδιότητες (250).

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ

Στο γενικό πληθυσμό που ελέγχεται στα πλαίσια της δευτερογενούς πρόληψης με τεστ Παπανικολάου ο επιπολασμός των κυτταρολογικών αλλοιώσεων που συνηγορεί για CIN ανέρχεται παγκοσμίως μεταξύ 1.5 έως και 6% περίπου (251, 252). Εξ αυτών περίπου το 1,5% με 2% συνηγορεί υπέρ HgSIL, ενώ 3% με 4% υπέρ LgSIL (253).

Η πιο συνήθης πρακτική στην αντιμετώπιση γυναικών με παθολογικό κυτταρολογικό επίχρισμα, είναι η παραπομπή τους για κολποσκοπική εξέταση ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα διήθησης και να αποφασιστεί η περαιτέρω αντιμετώπισή τους είτε με βιοψίες είτε με θεραπευτικές τεχνικές, προκειμένου να γίνει ιστολογική διάγνωση της αλλοίωσης. Ενδείξεις παραπομπής είναι η ύπαρξη οποιασδήποτε παθολογίας σε επαναλαμβανόμενα δείγματα, ορισμένες περιπτώσεις ήπιας δυσκαρύωσης, μέτρια ή σοβαρή δυσκαρύωση, σε υποψία διήθησης ή αδενικής νόσου, σε περίπτωση συμπτωμάτων όπως η εμμένουσα αιμορραγία μετά από επαφή καθώς και σε προηγηθείσα θεραπεία για υψηλόβαθμη ενδοτραχηλική αλλοίωση (254-257). Επίσης, γυναίκες με επαναλαμβανόμενα ανεπαρκή δείγματα θα πρέπει να παραπέμπονται για κολποσκόπηση καθώς θα πρέπει να αποκλειστεί η περίπτωση διηθητικής νόσου (258). Τέλος, η εμφάνιση ενδομητρικών κυττάρων στο τραχηλικό επίχρισμα σε γυναίκες κάτω των 40 ετών δεν καταδεικνύει παθολογία, ενώ σε γυναίκες άνω των 40 ετών η ερμηνεία ενός τέτοιου κυτταρολογικού αποτελέσματος ποικίλει, και θα πρέπει να συσχετίζεται με την ημέρα του κύκλου και με το γυναικολογικό ιστορικό τους. Συγκεκριμένα, γυναίκες οι οποίες λαμβάνουν αντισυλληπτικά, σκευάσματα ορμονικής υποκατάστασης ή ταμοξιφένη και φέρουν ενδομήτριο σπείραμα πρέπει να αποκλείονται ως υποψήφιας για παθολογία του ενδομητρίου, ενώ υποψία κακοήθειας υπάρχει όταν τα κύτταρα αυτά ανευρίσκονται μετά τη 14^η ημέρα του κύκλου τους (259, 260). Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν συνδέσει το εύρημα αυτό με την τεχνική λήψης του δείγματος χρησιμοποιώντας κυτταρολογία υγρής φάσης.

Στην περίπτωση ήπιων δυσκαρυωτικών αλλοιώσεων στο κυτταρολογικό επίχρισμα, συνήθως γίνεται επανάληψη της δειγματοληψίας και στη συνέχεια παραπομπή για κολποσκόπηση. Η μεγαλύτερη τυχαιοποιημένη μελέτη TOMBOLA, μελέτησε

γυναίκες με χαμηλόβαθμες κυτταρολογικές αλλοιώσεις χωρίζοντας τον υπό μελέτη πληθυσμό σε δύο ομάδες. Σε αυτές που παραπέμφθηκαν άμεσα για κολποσκόπηση και σε εκείνες που παρακολούθηθηκαν αρχικά με επανάληψη της κυτταρολογικής δειγματοληψίας. Όπως προέκυψε, οι γυναίκες οι οποίες παραπέμφθηκαν άμεσα για κολποσκόπηση είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να διαγνωστούν με CIN2+ αλλοίωση και να οδηγηθούν σε θεραπεία ως αποτέλεσμα υπερδιάγνωσης (261, 262).

Σε γυναίκες με borderline πυρηνικές αλλοιώσεις συνήθως γίνεται επανάληψη κυτταρολογικού δείγματος σε μεσοδιαστήματα 3-4 μηνών και όταν τα ευρήματα παραμένουν, τότε παραπέμπονται για κολποσκόπηση ώστε να αποκλειστεί ενδοτραχηλική νόσος (παθολογία του αδενικού επιθηλίου) ή υψηλόβαθμη τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του πλακώδους επιθηλίου (254). Στην κατηγορία αυτή borderline κυτταρολογικής διάγνωσης ανήκουν οι γυναίκες με διάγνωση ASCUS και αδενικά κύτταρα στο κυτταρολογικό τους επίχρισμα (AGUS-AGNOS).

Σε συστηματική τυχαιοποιημένη μελέτη από την Αμερική φάνηκε ότι οι γυναίκες με ASCUS έχουν 11% πιθανότητα να υποκρύπτουν υψηλόβαθμη αλλοίωση, ενώ αντίστοιχες προοπτικές μελέτες προερχόμενες από τη Μ. Βρετανία έδειξαν ότι η επίπτωση CIN2/3 είναι της τάξεως του 36% (263-265). Προς την κατεύθυνση αυτή, της διαλογής (trriage) των γυναικών με ASCUS ή AGC (Atypical Grandular Cells) στο κυτταρολογικό τους επίχρισμα, οι οποίες βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε υψηλόβαθμη αλλοίωση (CIN2+), το HPV DNA test (HC2) φαίνεται, σύμφωνα με μελέτες, να αποτελεί την πλέον ευαίσθητη μέθοδο (194, 206, 210, 253, 266-268).

Αντίθετα, προς την κατεύθυνση της πρόβλεψης της εξέλιξης χαμηλόβαθμων κυτταρολογικά αλλοιώσεων (LgSIL), δεν έχει τεκμηριωθεί η αξιοπιστία καμίας μεθόδου διαλογής και η κολποσκοπική εξέταση σε συνδυασμό με επαναληπτική κυτταρολογική δειγματοληψία αποκτούν ιδιαίτερη κλινική σημασία στην παρακολούθηση των γυναικών αυτών (251, 269-276). Μειονεκτήματα αποτελούν στην περίπτωση της επαναλαμβανόμενης κυτταρολογίας το αυξημένο ποσοστό μη συμμόρφωσης (default) των γυναικών, ενώ στην περίπτωση της άμεσης παραπομπής για κολποσκόπηση, ο κίνδυνος υπερδιάγνωσης και υπερθεραπείας, με ταυτόχρονη επιβάρυνση των συστημάτων πληθυσμιακού ελέγχου (212, 273, 277-279). Ωστόσο, στις περιπτώσεις των χαμηλόβαθμων κυτταρολογικών αλλοιώσεων ο

κίνδυνος υπάρχουσας υψηλόβαθμης αλλοίωσης, παρά τον χαμηλόβαθμο κυτταρολογικό φαινότυπο, ή εξέλιξης της υπάρχουσας αλλοίωσης σε υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση κατά την επόμενη διατροφή, δεν φαίνεται να είναι μεγαλύτερος από 10% έως 20% (57).

Ο κίνδυνος εξέλιξης της αδενικής νόσου σε κακοήθεια ή προδιηθητική αλλοίωση φαίνεται να είναι υψηλότερος σε ποσοστό 4-16% και 17-40% αντιστοίχως μεταξύ των θετικών δειγμάτων (280-283).

Στις γυναίκες με μέτρια δυσκαρύωση, τυχαιοποιημένες μελέτες κατέδειξαν, ότι στο 74-77% ανευρίσκεται υψηλόβαθμη κυτταρολογική αλλοίωση τη στιγμή της κολποσκόπησης, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε περίπτωση σοβαρών δυσκαρυωτικών αλλοιώσεων φτάνει το 80-90% (269, 284). Η φυσική ιστορία της αδενικής νεοπλασίας παραμένει αδιευκρίνιστη με τις περισσότερες υπάρχουσες μελέτες να συνηγορούν υπέρ της άμεσης παραπομπής για κολποσκόπηση, καθώς όπως έχει φανεί συνδέεται με υψηλά ποσοστά διήθησης (40-43%) και προδιηθητικής νόσου (20-28%) (280, 285).

Σύμφωνα με την παγκόσμια πρακτική, οι γυναίκες με υψηλόβαθμη αλλοίωση στο κυτταρολογικό τους επίχρισμα θα πρέπει να υποβάλλονται σε άμεσο κολποσκοπικό έλεγχο και σε αφαιρετική θεραπεία της Ζώνης Μετασχηματισμού, ή να γίνεται ιστολογική διερεύνηση της αλλοίωσης υπό τη μορφή της διαγνωστικής εκτομής. Παρά ταύτα και στην ομάδα αυτή, η ιστολογική επιβεβαίωση υψηλόβαθμων αλλοιώσεων αφορά ένα ποσοστό περίπου 70% στην περίπτωση CIN2+ και 50% στην περίπτωση των αλλοιώσεων CIN3+ (57, 286). Σύμφωνα, με τη μετα-ανάλυση του Mitchell MF et al, η κολποσκόπηση έχει αυξημένη δυνατότητα στην ανίχνευση των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων σε σχέση με τις χαμηλόβαθμες, με ευαισθησία της τάξεως 85%, αλλά χαμηλή ειδικότητα 69% και με υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (287).

Λαμβάνοντας υπόψη το ατυχές παράδειγμα της Νέας Ζηλανδίας, παραμένει ως πρόκληση σε ερευνητικό επίπεδο, η ανεύρεση παραμέτρου ή παραμέτρων συνδυαζόμενων αθροιστικά μεταξύ τους που θα μπορούσαν να ανιχνεύσουν τον πληθυσμό των γυναικών με πραγματικό κίνδυνο (CIN3+) ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου (227, 228, 231, 233, 288).

Ιδιαίτερη προσοχή στην ερμηνεία και διαχείριση των παθολογικών κυτταρολογικών επιχρισμάτων, απαιτείται σε εγκύους, σε γυναίκες οι οποίες λαμβάνουν αντισυλληπτικά δισκία, κατά την εμμηνόπαυση, μετά από υστερεκτομή και σε ανοσοκατεσταλμένες ασθενείς. Ειδικότερα, όπως έχει φανεί από μια σειρά μελετών, μπορεί με ασφάλεια να καθυστερήσει οποιαδήποτε απόφαση για θεραπευτική παρέμβαση στη διάρκεια της κύησης και αυτό γιατί η επίπτωση εμφάνισης διήθησης είναι χαμηλή χωρίς να υπάρχει απόδειξη ότι η κύηση μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη της νόσου (289-293). Συνεπώς, οι γυναίκες αυτές μπορούν να παραπεμφθούν για κολποσκόπηση στην περίπτωση παθολογικής κυτταρολογίας και να γίνει επανάληψη της εξέτασης στο τέλος του δευτέρου τριμήνου όταν υπάρχει υποψία υψηλόβαθμης τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (294).

Στην περίπτωση των γυναικών που λαμβάνουν αντισυλληπτική αγωγή ή θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης δεν έχει αποδειχθεί ότι η παύση των λαμβανόμενων σκευασμάτων μπορεί να αναστρέψει την κυτταρολογική διάγνωση και η μόνη συσχέτιση που υπάρχει είναι το αυξημένο σχετικά ποσοστό επίπτωσης CIN μετά από μόλυνση με τον HPV σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (295, 296).

Τέλος, από την υπάρχουσα βιβλιογραφία φαίνεται ότι οι γυναίκες που είναι ανοσοκατεσταλμένες εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο να έχουν ψευδώς αρνητική κυτταρολογία και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης CIN της τάξεως του 20-40% (297, 298).

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ CIN

Είναι γνωστό, ότι οι γυναίκες που για οποιοδήποτε λόγο αποφασίστηκε να υποβληθούν σε θεραπευτική επέμβαση, πρέπει να παρακολουθούνται στενά για διάστημα εικοσαετίας ή και περισσότερο με επαναλαμβανόμενη κυτταρολογία και κολποσκόπηση, αφ ενός λόγω του κινδύνου θεραπευτικής αποτυχίας που ανέρχεται περίπου στο 5-10% των περιπτώσεων, και αφ ετέρου λόγω του πολλαπλάσιου κινδύνου ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου παρά τη θεραπεία. Ο κίνδυνος αυτός φαίνεται να είναι 4 με 5 φορές μεγαλύτερος του κινδύνου που διατρέχει ο γενικός πληθυσμός, ενώ φαίνεται να παραμένει υπαρκτός έως 20 και πλέον χρόνια μετά τη θεραπεία. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι το 50% των γυναικών με προηγηθείσα επέμβαση που θα αναπτύξουν μελλοντικά διηθητική νόσο ανήκουν στην ομάδα μη συμμόρφωσης στην προγραμματισμένη μετεγχειρητική παρακολούθηση (137, 254, 299-313).

Προγνωστικοί παράγοντες θεραπευτικής αποτυχίας θεωρούνται: α) η παρουσία ή απουσία νόσου στα εγχειρητικά όρια, β) η ηλικία (>35 έτη), γ) η παρουσία νόσου στα όρια του ενδοτραχήλου, δ) η παρουσία νόσου στα αδένια του ενδοτραχήλου, ε) η παρουσία HPV δορυφορικών αλλοιώσεων πέρα της ζώνης μετάπτωσης, στ) το μέγεθος και η ιστολογική βαθμίδα της αλλοίωσης (137, 254).

Η κοινά αποδεκτή διαδικασία παρακολούθησης των ασθενών μετά από θεραπευτική αφαίρεση ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης τραχήλου μήτρας παραμένει το Pap test με, κατά περίπτωση, κολποσκοπική εξέταση του τραχήλου της μήτρας (302, 308, 314, 315). Η εφαρμογή εναλλακτικών τεχνικών όπως το HPV DNA test και σε αυτή την πληθυσμιακή ομάδα έχει μελετηθεί εκτενώς (316, 317).

ΜΕΘΟΔΟΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Η σύγχρονη θεραπεία των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας (CIN) γίνεται είτε με τοπική εξάχνωση (ablation) της βλάβης, είτε με αφαιρετικές (excisional) μεθόδους αναλόγως πάντα της φύσεως και της έκτασης της εκάστοτε αλλοίωσης. Παραδοσιακά, πριν την κολποσκόπηση, όλες οι εν λόγω αλλοιώσεις θεραπεύονταν με κωνοειδή εκτομή με νυστέρι (knife excisional cone biopsy), ή με καταστροφική εξάχνωση με μπίλια διαθερμίας (ablative radical point diathermy). Οι δύο τελευταίες μέθοδοι συνήθως πραγματοποιούνταν υπό γενική αναισθησία και έχουν πλέον περιοριστεί σε σημαντικό βαθμό, καθώς έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα πιο συντηρητικών, τόσο καταστροφικών όσο και αφαιρετικών μεθόδων θεραπείας, οι οποίες εκτελούνται σε βάση εξωτερικού ιατρείου. Κατά κανόνα οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι θεραπείας στις μέρες μας είναι:

- A. Η κωνοειδής εκτομή με νυστέρι (Knife cone biopsy - Cold Knife Conization),
- B. Η laser κωνοειδής εκτομή (Laser conisation)
- Γ. Η ευρεία κωνοειδής εκτομή της ζώνης μετάπτωσης με την αγκύλη διαθερμίας (LLETZ - Large loop excision of the transformation zone για τους Βρετανούς ή LEEP - Loop electrosurgical excisional procedure για τις Ηνωμένες Πολιτείες τις Αμερικής
- Δ. η Εξάχνωση με χρήση Laser (Laser ablation)
- E. η Κρυοθεραπεία (Cryotherapy)

Απαραίτητες προϋποθέσεις εφαρμογής των καταστροφικών μεθόδων είναι: α) η ικανοποιητική κολποσκόπηση (TZ τύπου I), β) η απουσία υποψίας διηθητικής νόσου, γ) η μη συμμετοχή του αδενικού επιθηλίου στη βλάβη, και δ) η συμφωνία στα αποτελέσματα της κυτταρολογίας και της ιστολογίας των μικροβιοψιών που έχουν προηγηθεί της εφαρμοζόμενης μεθόδου. Αφαιρετική μέθοδος θεραπείας είναι υποχρεωτικό να εφαρμόζεται σε γυναίκες με μη ικανοποιητική κολποσκόπηση, υποψία διήθησης και δυσπλασία του αδενικού επιθηλίου.

Η σημερινή πρακτική συνίσταται στην χρησιμοποίηση μεθόδων με μικρότερη νοσηρότητα, όπως η Laser κωνοειδής εκτομή (Laser Conisation) ή η ευρεία κωνοειδής εκτομή της ζώνης μετάπτωσης με την αγκύλη διαθερμίας (Large Loop Excision of the Transformation Zone - LLETZ), σε σύγκριση με τις καταστροφικές

μεθόδους. Επιπλέον, οι αφαιρετικές μέθοδοι φαίνεται ότι παρέχουν πλεονεκτήματα έναντι των καταστροφικών, όσον αφορά το ιστολογικό παρασκεύασμα που προκύπτει από το παρασκεύασμα της αφαίρεσης, οδηγώντας σε εγκυρότερη ιστολογική διάγνωση για τη φύση της αλλοίωσης και την επάρκεια αφαίρεσης της Ζώνης Μετασχηματισμού (TZ). Η ατελής αφαίρεση ή καταστροφή της TZ θεωρείται σημαντικός δείκτης θεραπευτικής αποτυχίας (Treatment Failure - TF) ή αυξημένου κινδύνου υποτροπής της νόσου (recurrence) (318).

A. Κωνοειδής εκτομή με νυστέρι (Knife cone biopsy - Cold Knife Conization)

Παραδοσιακή μέθοδος θεραπείας των CIN αλλοιώσεων υπήρξαν οι ευρείες και βαθιές εκτομές με τη χρήση νυστεριού. Ωστόσο, η εξαίρεση ενός μεγάλου σε πλάτος και βάθος κώνου, συσχετίστηκε σύντομα, τόσο με άμεση όσο και απώτερη μετεγχειρητική νοσηρότητα (πρωτοπαθής και δευτεροπαθής αιμορραγία, τοπική και γενικευμένη πυελική φλεγμονή, στένωση τραχήλου, και πρόωρη απώλεια κυήματος λόγω ανεπάρκειας τραχήλου) (319, 320). Στη σημερινή κλινική πρακτική, είναι πλέον γενικώς αποδεκτή η λιγότερο ριζική αφαιρετική προσέγγιση των αλλοιώσεων αυτών, με προσμέτρηση του βάθους και του πλάτους του κώνου σύμφωνα με τα κολποσκοπικά ευρήματα σε κάθε περίπτωση. Η μέθοδος απαιτεί γενική αναισθησία, ενώ η περιεγχειρητική αιμόσταση είναι δύσκολο να επιτευχθεί, γι αυτό και έχουν αναπτυχθεί διάφορες χειρουργικές τεχνικές προς την κατεύθυνση αυτή, όπως απολίνωση των τραχηλικών αγγείων, ραφές κατά Sturmdorf, περιφερικές ειδικές ραφές περίπαρσης, ηλεκτροκαυτηρίαση ή κρυοπηξία της αιμορραγικής περιοχής του τραχήλου, ή ακόμη μετεγχειρητική χρήση κολπικών ταμπόν. Η αποτελεσματικότητα της κωνοειδούς εκτομής με νυστέρι, αναφέρεται μεταξύ 90% έως 94% σε μη τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές, αφού όπως είναι επόμενο, η ύπαρξη υπολειπόμενης αλλοίωσης μετά την εφαρμογή της μεθόδου ελαχιστοποιείται (321-323).

B. Laser κωνοειδής εκτομή (Laser conisation)

Η μέθοδος αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με γενική είτε με τοπική αναισθησία. Μια υψηλής εστίασης ακτίνα Laser χρησιμοποιείται για τη δημιουργία περιφερικής τομής βάθους 1 cm, και με τη χρήση χειρουργικών εργαλείων

συγκράτησης (small hooks ή retractors), και κινητοποίηση του κώνου ακολουθεί βαθύτερη εκτομή του ενδοτραχήλου. Η αιμόσταση, εφόσον αυτή απαιτείται, γίνεται με τη χρήση της ακτίνας του Laser αυξάνοντας το πλάτος της δέσμης αυτού.

Το βασικότερο μειονέκτημα της Laser κωνοειδούς εκτομής, είναι ότι το παρασκεύασμα του κώνου μπορεί να έχει υποστεί μεγάλη θερμική καταστροφή, καθιστώντας την ιστολογική διάγνωση των ορίων εκτομής αδύνατη (318). Η αποτελεσματικότητα της Laser κωνοειδούς εκτομής αναφέρεται σε μη τυχαιοποιημένες μελέτες να διακυμαίνεται από 93% έως και 96% (321, 323). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου, είναι η επαρκής και σχηματοποιημένη εξαίρεση του τραχηλικού ιστού με τη μορφή κώνου, η ελαχιστοποίηση της απώλειας αίματος και το περιορισμένο τραχηλικό τραύμα συγκριτικά με την κωνοειδή εκτομή με νυστέρι.

Γ. Ευρεία κωνοειδής εκτομή της ζώνης μετάπτωσης με την αγκύλη διαθερμίας (LLETZ / LEEP)

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση ενός συρμάτινου ηλεκτροδίου σε σχήμα αγκύλης, προσαρμοσμένο στο τέλος ενός μονωμένου χειροκίνητου εξαρτήματος το οποίο είναι συνδεδεμένο σε μία ηλεκτροχειρουργική μονάδα (συσκευή διαθερμίας), με τη δυνατότητα να καίει (coagulate) και να κόβει (cut) παράλληλα, με τη χρήση τέτοιας ισχύος, ικανής να επιτυγχάνεται εκτομή του ιστού χωρίς την πρόκληση θερμικού artefact. Η μέθοδος πραγματοποιείται κατά κανόνα με τοπική αναισθησία και έχει εύκολη και γρήγορη καμπύλη εκμάθησης. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, εκτιμάται σε ποσοστά 91%, 94%, 95%, 96% έως και 98% σε μη τυχαιοποιημένες μελέτες (261, 324-328).

Δ. Εξάχνωση με χρήση Laser (Laser ablation)

Μια δέσμη Laser χρησιμοποιείται για την καταστροφή του τραχηλικού ιστού που φέρει την ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση στη ζώνη μετασχηματισμού. Η αύξηση της δέσμης της ακτίνας του laser επιτρέπει την φωτοπηξία των αγγείων που αιμορραγούν στο τραχηλικό τραύμα. Η αποτελεσματικότητα της Laser Εξάχνωσης, αναφέρεται σε ποσοστό της τάξεως του 95%-96% (329).

Ε. Κρυοθεραπεία

Η κρυοθεραπεία βασίζεται στην εξάτμιση συμπιεσμένου ψυκτικού αερίου το οποίο περνά μέσα από τη βάση ενός μεταλλικού κυκλικού probe που τοποθετείται σε επαφή με τη ζώνη μετασχηματισμού του τραχήλου. Η κρυονέκρωση επιτυγχάνεται με την κρυσταλλοποίηση των μορίων του νερού στον ενδοκυττάριο χώρο. Το αποτέλεσμα της μεθόδου συνήθως καταλήγει σε νέκρωση των ιστών και ανομοιογένεια της εικόνας του τραχήλου, καθώς συνυπάρχει και νέκρωση στην περιφέρεια του probe. Παλαιότερα, σε μη τυχαιοποιημένες μελέτες, η επιτυχία της μεθόδου στην θεραπεία σοβαρών δυσπλαστικών αλλοιώσεων (CIN3) κυμαινόταν από 77% έως και 93% (330-334). Μεταγενέστερα, η χρησιμοποίηση της εναλλασσόμενης τεχνικής διπλής ψύξης (freeze-thaw-freeze technique), φάνηκε να αυξάνει την αξιοπιστία της μεθόδου στην μελέτη παρατήρησης των Creasman W, Hinshaw W και Clarke-Pearson D το 1984 (335).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ HPV

Παρά το γεγονός ότι μέχρι τις αρχές του 2000 η επιστημονική κοινότητα ήταν διχασμένη ως προς την παρεχόμενη προστασία από τη χρήση προφυλακτικού έναντι στα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, πλέον έχει αποδειχθεί ότι η συστηματική χρήση προφυλακτικού μειώνει τον κίνδυνο μετάδοσης των περισσότερων σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων όπως ο HIV, ο Herpes Simplex Virus, η γονόρροια, τα χλαμύδια και η σύφιλη τόσο στις γυναίκες όσο και στους άντρες (336-341).

Όσον αφορά την επίδραση της συστηματικής χρήσης προφυλακτικού στη μετάδοση του ιού HPV, μια πρώτη προσπάθεια μελέτης έγινε από τις Lisa Manhart και Laura Koutsky το 2002. Συγκεκριμένα, με τον σχεδιασμό μιας μετα-ανάλυσης προσπάθησαν να ερευνήσουν τόσο την αποτελεσματικότητα του προφυλακτικού στην παρεμπόδιση της μετάδοσης του ιού, όσο και την ικανότητα του να αναστέλλει την ανάπτυξη γενετικών κονδυλωμάτων, CIN και διηθητικού καρκίνου. Στην εν λόγω μετα-ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 20 προγενέστερες μελέτες που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής. Παρά το γεγονός ότι η εν λόγω μετα-ανάλυση βασίστηκε σε cross-sectional και case-control μελέτες, κάτι που καθιστούσε προβληματική την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων, οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση προφυλακτικού δεν μπορεί να προστατεύσει από την μετάδοση της λοίμωξης, μπορεί όμως να προφυλάξει τους χρήστες από την ανάπτυξη γενετικών κονδυλωμάτων, αλλοιώσεων CIN2 ή CIN3 και διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (342).

Το 2003, η ομάδα του Chris Meijer από την Ολλανδία, δημοσίευσε δύο τυχαιοποιημένες μελέτες σχετικές με την προστασία που παρέχει η χρήση προφυλακτικού έναντι του HPV. Η πρώτη από αυτές αφορούσε άντρες των οποίων οι σεξουαλικοί σύντροφοι παρουσίαζαν παθολογική κυτταρολογία (>LgSIL) ή/και κολποσκοπική εικόνα και ιστολογική διάγνωση (CIN1+). Η μελέτη κατέληξε, ότι η χρήση προφυλακτικού από τους άντρες γυναικών που παρουσίαζαν CIN αλλοιώσεις μείωνε στατιστικά σημαντικά τον μέσο χρόνο της υποστροφής της αλλοίωσης σε επίπεδες αλλοιώσεις του πέους. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της χρήσης προφυλακτικού ήταν ορατά μετά από τρίμηνη χρήση και φαινόταν να είναι

παρόμοια με παράταση της χρήσης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (343). Μια εύλογη εξήγηση της παραπάνω επίδρασης της χρήσης προφυλακτικού θα μπορούσε να είναι η παρεμπόδιση της ιικής μετάδοσης μεταξύ των σεξουαλικών συντρόφων, η οποία με τη σειρά της μειώνει το ιικό φορτίο επιταχύνοντας την εξουδετέρωση του ιού και συνεπώς, την μείωση του χρόνου υποστροφής των αλλοιώσεων (344).

Η δεύτερη μελέτη είχε ως στόχο την διερεύνηση των αποτελεσμάτων της συστηματικής χρήσης προφυλακτικού σε γυναίκες που παρουσίαζαν εμμένουσα HPV λοίμωξη και CIN αλλοιώσεις, ως προς την υποστροφή των αλλοιώσεων και την κάθαρση της λοίμωξης. Τα συμπεράσματα της μελέτης έδειξαν ότι η συστηματική χρήση προφυλακτικού στις εν λόγω γυναίκες για διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών, προάγει την κάθαρση του ιού και την υποστροφή των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, με τους ερευνητές να επισημαίνουν πως η χρήση προφυλακτικού θα μπορούσε να αποτελέσει εκτός των άλλων: α) μια εναλλακτική πρόταση στην διαχείριση των εγκύων γυναικών με CIN στις οποίες η θεραπεία αντιμετωπίζει δυσκολίες, καθώς επίσης και β) παράγοντα μείωσης του αριθμού των άσκοπων επεμβάσεων σε γυναίκες με τραχηλικές δυσπλασίες (345).

Το 2004 η Susie B. Baldwin et al, δημοσίευσε μελέτη που αφορούσε τον αντρικό πληθυσμό συμπεραίνοντας πως η περιτομή και η συστηματική χρήση προφυλακτικού αποτελούν σημαντικούς παράγοντες μείωσης του κινδύνου μετάδοσης HPV λοίμωξης τόσο από ογκογόνους όσο και από μη ογκογόνους τύπους. Στην ίδια μελέτη υπογραμμίζεται το γεγονός της αυξανόμενης εμφάνισης τραχηλικών δυσπλασιών, καρκίνου του πρωκτού και θηλωματώδους καρκίνου του αιδοίου, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει το ρόλο του αντρικού πληθυσμού ως ενδιάμεσου ξενιστή στη διαδικασία μετάδοσης του ιού (346). Επομένως, η συστηματική χρήση προφυλακτικού καθώς και η υγιεινή των γεννητικών οργάνων φαίνεται να αποτελούν φραγμούς στη μετάδοση των HPV λοιμώξεων (347).

Μια ακόμη τυχαίοποιημένη κλινική δοκιμή από τους RL. Winer et al. το 2006 που αφορά τον κίνδυνο μετάδοσης HPV λοιμώξεων σε νέες γυναίκες, καταλήγει και πάλι στο συμπέρασμα ότι η συστηματική χρήση προφυλακτικού μειώνει αποτελεσματικά τον κίνδυνο μετάδοσης του ιού από άντρες σε γυναίκες με πρόσφατη έναρξη των σεξουαλικών επαφών. Η μελέτη επισημαίνει πως οι γυναίκες των οποίων οι σύντροφοι χρησιμοποίησαν προφυλακτικό σε όλες τις σεξουαλικές επαφές για το

χρονικό διάστημα των προηγούμενων 8 μηνών, είχαν 70% λιγότερες πιθανότητες να νοσήσουν σε σχέση με τις γυναίκες των οποίων οι σύντροφοι χρησιμοποίησαν προφυλακτικό σε ποσοστό μικρότερο του 5% των επαφών τους το ίδιο χρονικό διάστημα. Επιπρόσθετα, η χρήση προφυλακτικού σε ποσοστό άνω του 50% από τους συντρόφους των γυναικών είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του κινδύνου μετάδοσης του ιού στις γυναίκες κατά 50% σε σύγκριση με τον κίνδυνο που διέτρεχαν οι γυναίκες των οποίων οι σεξουαλικοί σύντροφοι χρησιμοποιούσαν προφυλακτικό σε λιγότερες του 5% των επαφών τους. Οι ερευνητές τονίζουν ότι η συστηματική χρήση προφυλακτικού περιορίζει ιδιαίτερα δραστικά τον κίνδυνο μετάδοσης του ιού και συστήνουν την συστηματική χρήση προφυλακτικού ακόμη και σε γυναίκες οι οποίες έχουν εμβολιαστεί, με σκοπό την μείωση της έκθεσής τους σε HPV τύπους που μπορούν να οδηγήσουν σε τραχηλικές δυσπλασίες και καρκίνους (60, 69, 348).

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Βασιζόμενοι στις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, γνωρίζουμε ότι μετά από συντηρητική (αφαιρετική/καταστροφική) θεραπεία για προκαρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας, οι γυναίκες πρέπει να παρακολουθούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα, λόγω της πιθανότητας (~10%) επανεμφάνισης CIN, αλλά και λόγω του αυξημένου κίνδυνου ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ο οποίος παραμένει για 20 και πλέον έτη σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Η παρακολούθηση πραγματοποιείται με επαναλαμβανόμενη κυτταρολογία ή και κολποσκόπηση.

Αν και ο θεραπευτικός στόχος είναι η εξαίρεση του δυσπλαστικού ιστού (CIN), και όχι η εκρίζωση του ιού, σε ένα ποσοστό 40 έως 80% έχει παρατηρηθεί ότι οι γυναίκες γίνονται HPV αρνητικές 6 έως 12 μήνες μετά από τη θεραπεία. Δεδομένου ότι οι HPV DNA θετικές γυναίκες διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής της νόσου, κρίνεται αναγκαία η πιο στενή παρακολούθησή τους, σε σχέση με αυτές που ανευρίσκονται αρνητικές για το συγκεκριμένο test. Προς την κατεύθυνση αυτή, η μετεγχειρητική παρακολούθηση με το HPV DNA test έχει μελετηθεί εκτενώς και όλες οι υπάρχουσες μελέτες συνηγορούν στο ότι το εν λόγω test μπορεί να ανιχνεύει ταχύτερα τις πιθανές υποτροπές της νόσου σε σχέση με τη συμβατική κυτταρολογία (test of cure) (194, 266, 349).

Ειδικότερα, το HPV DNA test φαίνεται να πλεονεκτεί στην ανίχνευση υποτροπών έως και 2 έτη μετά τη θεραπεία, με ευαισθησία 94.4% σε σχέση με το Pap test και την ιστολογική διάγνωση των ορίων (υγιή ή μη) εκτομής. Εντούτοις, μετά την πάροδο της διαιτίας από τη θεραπεία, προκύπτει πως η ευαισθησία τόσο του Pap test, όσο και του HPV DNA test συγκλίνουν (213, 214).

Ωστόσο, εκτός από την ευαισθησία των χρησιμοποιούμενων μεθόδων στη μετεγχειρητική παρακολούθηση κρίνεται αναγκαία και η ανεύρεση μεθοδολογίας ελάττωσης του ιικού φορτίου, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί η θεραπεία αυτή κάθε αυτή δεν οδηγεί σε απόλυτη εκρίζωση του ιού. Προς την κατεύθυνση αυτή υπάρχει μέχρι τώρα πληθώρα μελετών, τόσο αναδρομικών-παρατήρησης, όσο και τυχαιοποιημένων-προοπτικών, οι οποίες αναφέρονται στη χρήση του προφυλακτικού στο γενικό πληθυσμό και την επίδραση αυτού στη φυσική ιστορία

της HPV λοίμωξης. Καμία μελέτη, μετά από λεπτομερή έρευνα της τρέχουσας βιβλιογραφίας σε όλες τις έγκυρες βάσεις ιατρικών δεδομένων (PUBMED, EMBASE, SCOPUS, Cochrane database), δεν έχει πραγματοποιηθεί με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της συστηματικής χρήσης του προφυλακτικού στη μεταβολή της έκφρασης των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών (HPV DNA, mRNA E6 E7, p16) μετά από θεραπεία για προκαρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας. Δεδομένου ότι η τεκμηρίωση επιστημονικών υποθέσεων στη σημερινή ιατρική πράξη προκύπτει από τις τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές και τη μετα-ανάλυση αυτών (Level of Evidence IB και IA αντίστοιχα), σχεδιάστηκε η παρούσα τυχαιοποιημένη μελέτη, στόχος της οποίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης της συστηματικής χρήσης του προφυλακτικού στο HPV status (εκτιμώμενο με διάφορους HPV-σχετιζόμενους βιοδείκτες), μετά από αφαιρετική θεραπεία για προκαρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Κριτήρια εισαγωγής

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν γυναίκες που προσήλθαν στο ιατρείο κολποσκόπησης και παθολογίας τραχήλου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, με οποιαδήποτε παθολογική κυτταρολογία, υποβλήθηκαν σε κολποσκόπηση και εφόσον κρίθηκε απαραίτητο, προχωρήσαμε σε αφαιρετική θεραπεία της ζώνης μετασχηματισμού. Κατά κανόνα, και βασισμένοι πάντα στις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, θεραπεία στο ιατρείο κολποσκόπησης και παθολογίας τραχήλου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων προτείνεται σε όλες τις γυναίκες με μέτρια και σοβαρή αλλοίωση, καρκίνωμα in Situ έως και μικροδιηθητικό καρκίνωμα (254).

Σημαντική παράμετρος στη λήψη απόφασης για θεραπευτική αντιμετώπιση αποτέλεσε και η επιθυμία μελλοντικής κύησης. Στην παρούσα μελέτη ενταχθήκαν και κάποιες γυναίκες οι οποίες είχαν και ήπιας μορφής δυσπλασία εμμένουσα για τουλάχιστο 2 έτη.

Η πολιτική του κέντρου μας είναι *'see, think, select and treat'* και στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν λαμβάνεται μικροσκοπική βιοψία από την τραχηλική βλάβη προκειμένου να εξακριβωθεί ιστολογικά η αλλοίωση.

Πρέπει να σημειωθεί πως σε όλες τις γυναίκες δόθηκε ενημερωτικό φυλλάδιο για το σκοπό της μελέτης και όλες όσες προθυμοποιήθηκαν να συμμετάσχουν υπέγραψαν συγκεκριμένη δήλωση συγκατάθεσης. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας και το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με αριθμό Πρωτοκόλλου 28/9-7-2009(Θ.21).

β. Κριτήρια αποκλεισμού

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη αποτέλεσαν η άρνηση των γυναικών να συμμετάσχουν και η ανεύρεση διηθητικής νόσου στο ιστολογικό παρασκεύασμα του αφαιρούμενου τραχηλικού ιστού (LLETZ). Σε αυτές τις περιπτώσεις, προχωρήσαμε σε ριζική υστερεκτομή με επικουρική ακτινοθεραπεία όπως επίσης

και βραχυθεραπεία, όπου αυτή κρίνεται απαραίτητη. Επιπλέον, από τη μελέτη εξαιρέθηκαν επίσης οι γυναίκες οι οποίες αποφασίστηκε να υποβληθούν σε υστερεκτομή για άλλους λόγους όπως συνύπαρξη καλοήθους παθολογίας κατώτερου γεννητικού συστήματος (πχ ινομυωματώδης μήτρα), καθώς επίσης και εκείνες οι οποίες είχαν υποβληθεί στο παρελθόν σε οποιαδήποτε είδους αφαιρετική θεραπεία τραχήλου μήτρας. Τέλος, από τη μελέτη εξαιρέθηκαν επίσης οι γυναίκες στις οποίες δεν έγινε λήψη υλικού σε δείγμα κυτταρολογίας υγρής φάσης (LBC).

γ. Μεθοδολογία

Σε όλες τις γυναίκες πριν από τη θεραπεία πραγματοποιήθηκε λήψη τραχηλικού επιχρίσματος υγρής φάσης (LBC), το οποίο αποστέλλεται τόσο για κυτταρολογική εξέταση όσο και για μοριακό έλεγχο HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών.

Ο υπό μελέτη γυναικείος πληθυσμός παραπέμφθηκε για κολποσκοπικό έλεγχο ύστερα από τη διάγνωση παθολογικού κυτταρολογικού επιχρίσματος είτε με τη συμβατική μέθοδο είτε με LBC.

Στις περιπτώσεις όπου το αποτέλεσμα της κυτταρολογίας συμφωνούσε με την κολποσκοπική εικόνα υπέρ υψηλόβαθμης αλλοίωσης (CIN2+), η λήψη μικροβιοψιών από την αλλοίωση για την επιβεβαίωση του βαθμού της αλλοίωσης δεν θεωρούνταν απαραίτητη και προγραμματιζόταν θεραπεία (LLETZ), σε μια δεύτερη επίσκεψη αμέσως μετά το πέρας της επόμενης εμμηνορυσίας της γυναίκας (350).

Στις περιπτώσεις όπου τόσο το αποτέλεσμα της κυτταρολογίας όσο και της κολποσκοπικής εξέτασης δεν ήταν ενδεικτικό υψηλόβαθμης αλλοίωσης, γινόταν λήψη μικροβιοψιών και εφόσον η ιστολογική εξέταση συνηγορούσε υπέρ υψηλόβαθμης αλλοίωσης, τότε αυτές οι γυναίκες και εφόσον το επιθυμούσαν, προγραμματιζόνταν για θεραπεία ξανά σε μια δεύτερη επίσκεψη αμέσως μετά το τέλος του επόμενου εμμηνορυσιακού τους κύκλου. Θεραπεία γινόταν επίσης και σε μερικές περιπτώσεις χαμηλόβαθμων κυτταρολογικά και κολποσκοπικά συνηγορούντων αλλοιώσεων CIN1, μετά από παρακολούθηση τουλάχιστον 2 ετών με κυτταρολογία και κολποσκόπηση σε γυναίκες που είχαν ολοκληρώσει τη

διαδικασία της τεκνοποίησης, σε αυτές που ήταν υπερβολικά αγχώδεις για την εξέλιξη της νόσου, και στις ελάχιστες περιπτώσεις γυναικών που δεν επιθυμούσαν την συντηρητική τακτική παρακολούθησης πέραν της διαιτίας.

Στη δεύτερη προγραμματισμένη επίσκεψη όπως αναφέρθηκε, σε όλες τις γυναίκες γινόταν λήψη ενός δείγματος κυτταρολογίας υγρής φάσης (LBC) με το ειδικό βουρτσάκι (Cervex-brush) της Rovers™ και μονιμοποίηση σε διάλυμα Thin Prep. Αυτή η διαδικασία γινόταν ακριβώς πριν τη θεραπεία σε όλες τις γυναίκες, και το διάλυμα αποστελλόταν τόσο για κυτταρολογική εξέταση όσο και για τους κάτωθι HPV-σχετιζόμενους βιοδείκτες:

1. HPV DNA test με Clinical Arrays HPV (Genomica Spain), ένα test τυποποίησης των ιών HPV για ανίχνευση 35 HPV γονότυπων. Το test θεωρήθηκε θετικό για HR τύπους, όταν γινόταν ανίχνευση ενός τουλάχιστο από τους κάτωθι τύπους του ιού: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 και 85.
2. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) για ενίσχυση RNA αλληλουχιών: μοριακοί ενισχυτές (probes) ενάντια στις πρωτεΐνες E6 και E7 του mRNA για τους 5 HR-HPV τύπους: 16, 18, 31, 33 and 45.
3. Αποτίμηση με κυτταρομετρία ροής (Flow cytometric evaluation) της έκφρασης των πρωτεϊνών E6 και E7 του mRNA όλων των HR-HPV τύπων (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 και 82) με τη χρήση του HPV OncoTect (Invirion Diagnostics, USA) και
4. p16 ανοσοϊστοχημεία (immunostaining) με τη χρήση του mtm kit το οποίο διανέμεται στην Ελλάδα από την DAKO (CINtec Cytology Kit mtm laboratories AG, Heidelberg, Germany). Το Dako AutoStainer σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση των επιχρισμάτων βάσει του πρωτοκόλλου για Thin Prep δείγματα. Ως θετικό αξιολογήθηκε το test, όταν τουλάχιστο ένα δυσπλαστικό κύτταρο ανιχνευόταν θετικό με χρώση για τον συγκεκριμένο δείκτη.

Η μέθοδος θεραπείας που χρησιμοποιήθηκε σχεδόν στο σύνολο των περιπτώσεων ήταν η εξαίρεση της ζώνης μετασχηματισμού με την αγκύλη διαθερμίας (LLETZ), λόγω της ευκολίας στη χρήση της και του πλεονεκτημάτος της να παρέχει την ιστολογική διάγνωση ολόκληρης της Ζώνης Μετασχηματισμού (311, 313, 318, 328, 351, 352)

Ελάχιστες ήταν οι περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε διαφορετική της LLETZ, μέθοδος θεραπείας. Σε μία μόνο γυναίκα έγινε Laser κωνοειδής εκτομή και σε 2 άλλες έγινε Laser εξάχνωση της αλλοίωσης, εφόσον είχαν προηγηθεί μικροβιοψίες των οποίων το ιστολογικό αποτέλεσμα επιβεβαίωσε τόσο την κυτταρολογική όσο και την κολποσκοπική εκτίμηση της χαμηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (CIN1).

Οι θεραπείες γίνονται κατά κανόνα με τη χρήση τοπικής αναισθησίας στον τράχηλο, πάντα υπό κολποσκοπική καθοδήγηση, με σκοπό να αφαιρεθεί ολόκληρη η αλλοίωση καθώς και όλη η ζώνη μετασχηματισμού (TZ) σε ένα και μόνο ιστοτεμάχιο (318, 351).

Επιπροσθέτως, σε όλες τις θεραπείες γίνονται περιφερική καυτηρίαση των ορίων του τραχηλικού κρατήρα με την χρήση της μπίλιας διαθερμίας (ball diathermy), τόσο για λόγους αιμόστασης όσο και για την θερμική καταστροφή τυχόν υπολειπόμενης δυσπλαστικής αλλοίωσης στα όρια της αφαίρεσης του κώνου.

Οι κολποσκόποι έδειχναν ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή του καυτηριασμού στο βάθος του τραχηλικού κρατήρα, κοντά στο νεοδημιουργηθέντα τραχηλικό σωλήνα, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο στατιστικά σημαντικά την πιθανότητα μη-ικανοποιητικής κολποσκόπησης μετεγχειρητικά (353).

Πρέπει να σημειωθεί, πως στις νέες άτοκες γυναίκες και στις γυναίκες οι οποίες επιθυμούσαν μελλοντική τεκνοποίηση γίνονται προεγχειρητικά σύσταση μέτρησης των τριών διαστάσεων του τραχήλου, καθώς επίσης και υπολογισμός του όγκου του τραχήλου με τρισδιάστατο κολπικό υπερηχογράφημα (3D-TVS) (354-356). Επιπλέον, σε αυτές τις γυναίκες, αμέσως μετά την αφαίρεση του τραχηλικού κώνου, προχωρήσαμε σε υπολογισμό του όγκου του εξαιρεθέντος ιστού με ογκομετρικό σωλήνα, και σε υπολογισμό, κατά προσέγγιση, του ποσοστού εξάχνωσης με τη μπίλια διαθερμίας (354). Σκοπός της διαδικασίας αυτής, ήταν ο υπολογισμός του συνολικού ποσοστού αφαίρεσης τραχηλικού ιστού, αφαιρώντας το από τον αρχικό-προεγχειρητικά υπολογισμένο υπερηχογραφικά όγκο του τραχήλου. Η διαδικασία αυτή αποτελεί ρουτίνα στο ιατρείο κολποσκόπησης και παθολογίας τραχήλου του νοσοκομείου μας καθώς τα δεδομένα δείχνουν πως οι αφαιρετικές μέθοδοι θεραπείας αυξάνουν στατιστικά σημαντικά τον κίνδυνο προωρότητας και περιγεννητικής θνησιμότητας σε μελλοντική εγκυμοσύνη, ενώ πιο πρόσφατα

δεδομένα ενοχοποιούν όχι τόσο το βάθος του εξαιρεθέντος κώνου εκτομής αλλά το ποσοστό αφαίρεσης του τραχηλικού ιστού κατά τη θεραπεία (212, 357-364).

Μετά το τέλος της επέμβασης, όλες οι γυναίκες λάμβαναν τις σχετικές μετεγχειρητικές οδηγίες και ενημερώνονταν για τη μετεγχειρητική παρακολούθησή τους με επαναλαμβανόμενη κυτταρολογία και κολποσκόπηση κάθε 6 μήνες επί 2 έτη μετά την επέμβαση και στη συνέχεια ανά έτος επί είκοσι έτη, λόγω του εν δυνάμει υπαρκτού κινδύνου της θεραπευτικής αποτυχίας και του κινδύνου ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου στο απώτερο μέλλον (251, 299-301, 309, 365).

Επίσης όλες οι γυναίκες διάλεξαν έναν φάκελο τυχαιοποίησης από μια αρχική βάση 300 σφραγισμένων φακέλων (150 στο κάθε Group), είτε Group A είτε Group B, το οποίο σήμαινε ότι οι γυναίκες στο Group A λάμβαναν επιπροσθέτως στις παραπάνω πληροφορίες (πληροφορίες ρουτίνας που έλαβε και το Group B), και την αυστηρή σύσταση για συστηματική χρήση προφυλακτικού στη διάρκεια όλων των σεξουαλικών τους επαφών μέχρι τη δεύτερη επίσκεψη.

Όλες οι κολποσκοπήσεις γίνονταν στο Εξωτερικό Ιατρείο Κολποσκόπησης και Παθολογίας Τραχήλου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, από δύο πιστοποιημένους κολποσκόπους. Οι θεραπείες πραγματοποιούνταν υπό κολποσκοπική καθοδήγηση με τη χρήση κολποσκοπίου που έδινε τη δυνατότητα μεγέθυνσης της αλλοίωσης από 6 έως 20 φορές, και με την επίθεση διαλύματος 5% οξεικού οξέος.

Το παρασκευάσμα του εξαιρεθέντος κώνου, αποστελλόταν για λεπτομερή ιστοπαθολογική εξέταση στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Όλα τα παθολογοανατομικά παρασκευάσματα εξετάστηκαν από ένα συγκεκριμένο έμπειρο πιστοποιημένο παθολογολογικό με εξειδίκευση την παθολογία του κατώτερου γυναικείου γεννητικού συστήματος και δίνοντας την απαιτούμενη προσοχή κατά τη διάγνωση, στο βαθμό κακοήθειας της αλλοίωσης, τη κατάσταση των χειρουργικών ορίων εκτομής της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης καθώς επίσης και τη συμμετοχή ή όχι στην αλλοίωση των ενδοτραχηλικών αδενίων.

Οι γυναίκες στις οποίες η ιστολογική εξέταση του παθολογοανατομικού παρασκευάσματος ήταν τελικά αρνητική, εξαιρέθηκαν από τη μελέτη, εκτός και αν σε αυτές είχαν παρθεί μικροβιοψίες προ της επέμβασης, στην πρώτη επίσκεψη, που

ήταν θετικές, οπότε ως τελική ιστολογική διάγνωση κατά τη θεραπεία θεωρήθηκε αυτή των μικροβιοψιών. Ως τελική ιστολογική διάγνωση κατά τη θεραπεία θεωρήθηκε αυτή των μικροβιοψιών και στις περιπτώσεις όπου ο βαθμός κακοήθειας της ενδοεπιθηλιακής βλάβης στις μικροβιοψίες ήταν μεγαλύτερος αυτού του παθολογοανατομικού παρασκευάσματος του κώνου.

Κατά την επίσκεψη στο ιατρείο κολποσκόπησης τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα, σε όλες τις γυναίκες αμέσως πριν την κολποσκοπική εξέταση, γινόταν λήψη ενός δευτέρου τραχηλικού επιχρίσματος υγρής φάσης (LBC), όπως προεγχειρητικά, το οποίο αποστέλλοταν στο ίδιο εργαστήριο για τις ίδιες αναλύσεις σε κυτταρολογικούς και μοριακούς HPV-σχετιζόμενους βιοδείκτες. Η κολποσκόπηση ακολουθούσε με την ίδια διαδικασία όπως ακριβώς και προεγχειρητικά, και τα αποτελέσματα αυτής καταγραφόταν στο φάκελο της ασθενούς.

Επιπλέον, σε όλες τις ασθενείς ζητήθηκε να συμπληρωθεί ένα ερωτηματολόγιο με διάφορες ερωτήσεις δημογραφικών χαρακτηριστικών (ηλικία, οικογενειακή κατάσταση, τεκνοποιία), ιστορικά στοιχεία σεξουαλικής συμπεριφοράς (ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών, αριθμός σεξουαλικών συντρόφων, ιστορικό πρωκτικών επαφών), καθώς επίσης και άλλους επιμέρους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την εμμονή της λοίμωξης (ποσοστιαία χρήση προφυλακτικού τόσο γενικά στη μέχρι σήμερα σεξουαλική τους ζωή, όσο και στην μετεγχειρητική περίοδο, κάπνισμα, χρήση αντισυλληπτικών δισκίων). Οι συμμετέχοντες κολποσκόποι ήταν ενήμεροι για το κυτταρολογικό αποτέλεσμα της γυναίκας πριν και μετά τη θεραπεία και σε μερικές περιπτώσεις, και για το αποτέλεσμα των μοριακών HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών.

Ως μέρος του πρωτοκόλλου της μελέτης, μετά την πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη στους 6 μήνες, ήταν και ο προγραμματισμός των επισκέψεων τους στους 6 μήνες, 12 μήνες, 18 μήνες και 24 μήνες και έπειτα ετησίως (36, 48, 60 μήνες). Η κάθε επίσκεψη θα συμπεριλάμβανε υλικό για κυτταρολογική εξέταση τραχηλικού επιχρίσματος υγρής φάσης (LBC), και ανάλυση μοριακών HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, όπως επίσης και κολποσκοπική εκτίμηση. Επίσης η κάθε γυναίκα, σε κάθε επίσκεψη θα συμπλήρωνε το προαναφερθέν ερωτηματολόγιο, ανανεώνοντας τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και τις σεξουαλικές της συνήθειες.

δ. Στατιστική Ανάλυση

Στατιστικές μέθοδοι όπως το Chi-square test και το McNemar's test χρησιμοποιήθηκαν στο να υπολογιστεί η σχέση των αποτελεσμάτων των βιοδεικτών πριν και μετά τη θεραπεία, καθώς και το συσχετισμό με διάφορες παραμέτρους της διαφοροποίησης της έκφρασης των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών στις προγραμματισμένες μετεγχειρητικές επισκέψεις.

Στο πλαίσιο αυτό, και με βάση την αυστηρή μαθηματική στατιστική, υπολογίστηκε το p-Value ως το σύνολο όλων των πιθανών αποτελεσμάτων στον υπό μελέτη πληθυσμό, χωρίς να έχει εντοπισθεί σφάλμα τύπου I. Δηλαδή, δεν έγινε καμία εσφαλμένη απόφαση κατά την οποία να απορριφτεί η μηδενική υπόθεση (Null Hypothesis) ενώ είναι αληθής (prosecutor's fallacy). Επιπλέον, υπολογίστηκε ο σχετικός κίνδυνος (Relative Risk - RR) ο οποίος εκφράζει την συχνότητα της πιθανότητας εκδήλωσης συμβαμάτων, συγκρίνοντας μια εκτεθειμένη με μία μη εκτεθειμένη στο σύμβαμα αυτό ομάδα του πληθυσμού, η μείωση του σχετικού κινδύνου (Relative Risk Reduction - RRR), δηλαδή η πιθανότητα να συμβεί ένα ενδεχόμενο σε ένα δείγμα πληθυσμού συγκριτικά με ένα άλλο δείγμα υπολογίζοντας τον κίνδυνο στην μια ομάδα δια του κινδύνου στην άλλη. Επίσης, υπολογίστηκε η απόλυτη μείωση κινδύνου (Absolute Risk Reduction - ARR), δηλαδή το ποσοστό κατά το οποίο ελαττώνεται ο κίνδυνος για να νοσήσει ένα άτομο του πληθυσμού αν ο παράγοντας κινδύνου ελαττωθεί ή εξαλειφθεί, υπολογίζοντας επίσης τη διαφορά μεταξύ της ποσοστιαίας επίπτωσης δυσμενών εκβάσεων στην ομάδα ελέγχου συγκριτικά με τους μάρτυρες, σε μια ελεγχόμενη κλινική δοκιμή (Risk Difference). Τέλος, υπολογίστηκε ο απαιτούμενος αριθμός θεραπειών (Number Needed to Treat - NNT) ο οποίος εκφράζει τον αριθμό των ατόμων του πληθυσμού που πρέπει να θεραπευθούν ώστε να προληφθεί ένα επιπλέον σύμβαμα.

Εκτός από αναλύσεις μονών μεταβλητών, έγιναν και επιπλέον αναλύσεις πολλαπλών μεταβλητών (multivariable analysis) με σκοπό τον υπολογισμό του κινδύνου της εμμονής των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, με τη χρήση ανάλυσης παλινδρόμησης (logistic regression analysis), προκειμένου να διερευνηθεί η πρόβλεψη των τιμών της μιας μεταβλητής (dependent variables) μέσω των τιμών

των άλλων μεταβλητών (independed variables). Έγινε υπολογισμός του δείκτη πιθανοτήτων (Odds ratio - OR) και των ορίων αξιοπιστίας αυτού (95% confidence intervals - 95% CI), δηλαδή ο σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων να συμβεί ένα ενδεχόμενο υπό μια συνθήκη A (π.χ. έκθεση) προς τον λόγο συμπληρωματικών πιθανοτήτων να συμβεί το ίδιο ενδεχόμενο υπό μια άλλη συνθήκη B (π.χ. μη έκθεση).

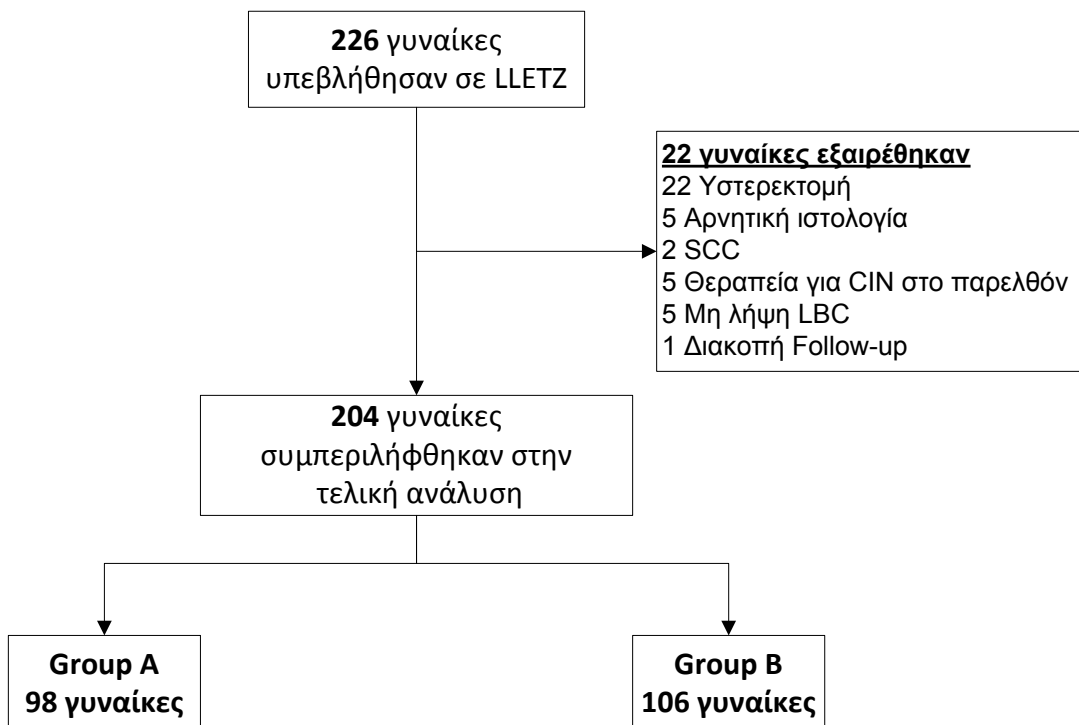
Επίσης έγινε υπολογισμός των παραμέτρων ακρίβειας (accuracy parameters) των συγκεκριμένων HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών όπως: α) Ευαισθησία (Sensitivity) για τον υπολογισμό του ποσοστού των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, β) Ειδικότητα (Specificity) για τον υπολογισμό του ποσοστού των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων όταν ελέγχεται μεγάλος αριθμός θετικών και αρνητικών δειγμάτων, γ) η θετική προγνωστική αξία (Positive Predictive Value - PPV) που εκφράζει το ποσοστό των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων (True Positive – TP), και δ) η αρνητική προγνωστική αξία (Negative Predictive Value - NPV) η οποία εκφράζει το ποσοστό των αληθώς αρνητικών αποτελεσμάτων (True Negative – TN). Τόσο η θετική όσο και η αρνητική προγνωστική αξία βρίσκονται σε άμεση συσχέτιση με τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου στον υπό μελέτη πληθυσμό (prevalence). Όλες οι προαναφερόμενες παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση-πρόβλεψη των μελλοντικών ιστολογικά επιβεβαιωμένων θεραπευτικών αποτυχιών, και υπολογίστηκαν ξεχωριστά για κάθε HPV-σχετιζόμενο βιοδείκτη, κατά τη μετεγχειρητική επίσκεψη του 6^{ου}, 12^{ου} και 24^{ου} μήνα.

Τέλος έγινε σύγκριση των ποσοστών των θεραπευτικών αποτυχιών μεταξύ των 2 ομάδων μελέτης με τη χρήση του Chi-squared το οποίο υπολογίζει την απάντηση δύο ανεξάρτητων ομάδων στην υπόθεση της μελέτης. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με το πρόγραμμα Stata.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Αρχικά στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 226 γυναίκες οι οποίες όλες υπεβλήθησαν σε θεραπεία λόγω CIN. Τρεις γυναίκες εξαιρέθηκαν διότι υποβλήθηκαν σε ολική υστερεκτομή κατά τους πρώτους 6 μήνες της μετεγχειρητικής παρακολούθησης, πέντε διότι είχαν αρνητική ιστολογία, δύο γυναίκες διότι βρέθηκαν να έχουν διηθητικό καρκίνο τραχήλου μήτρας (\geq stage IA2), έξι γυναίκες διότι είχαν υποβληθεί στο παρελθόν σε αφαιρετική θεραπεία για τραχηλική δυσπλασία, πέντε γυναίκες λόγω του γεγονότος ότι δεν πάρθηκε τραχηλικό επίχρισμα κυτταρολογίας υγρής φάσης πριν τη θεραπεία και μία γυναίκα η οποία δε συμμορφώθηκε με την προγραμματισμένη μετεγχειρητική παρακολούθηση. Έτσι, τελικά 204 γυναίκες συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση και εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Στο Group A 98 γυναίκες και στο Group B 106 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα (Flow chart) του υπό μελέτη πληθυσμού

I. Επιδημιολογικά στοιχεία

Η μέση ηλικία στο Group A ήταν 39 έτη (range: 20 - 59 years, median 39 years), ενώ στο Group B η μέση ηλικία υπολογίστηκε στα 37 έτη (range: 18 - 54 years, median 37 years). Οι γυναίκες στο Group B ήταν κατά μέσο όρο 1,7 έτη μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές του Group A (Πίνακας 5).

Το 65.3% (64/98) των γυναικών στο Group A είχε τεκνοποιήσει, όπως παρόμοια το 68.9% (73/106) στο Group B. Καπνίστριες δήλωσαν το 58% (57/98) στο Group A και το 47% (50/106) στο Group B αντίστοιχα. Το 75.5% (74/98) των γυναικών που τυχαιοποιήθηκαν στο Group A, δήλωσε πως ξεκίνησε τις σεξουαλικές επαφές σε ηλικία μεγαλύτερη των 18 ετών, ενώ το 57.1% (56/98) ανέφερε πως είχε περισσότερους από 3 σεξουαλικούς συντρόφους έως τη στιγμή της θεραπείας. Αντίστοιχα, οι γυναίκες που τυχαιοποιήθηκαν στο Group B δήλωσαν πως ξεκίνησαν τις σεξουαλικές επαφές σε ηλικία μεγαλύτερη των 18 ετών σε ποσοστό 73.6% (78/106), ενώ το 56.6% (60/106) εξ αυτών ανέφερε πως είχε περισσότερους από 3 σεξουαλικούς συντρόφους έως τη στιγμή της θεραπείας.

Πίνακας 5. Δημογραφικά στοιχεία πληθυσμού μελέτης ανάλογα με το Group τυχαιοποίησης

	Group A		Group B	
Μέση Ηλικία	38.82		37.16	
Τόκος (φυσιολογικός τοκετός)	64	65.30%	73	68.90%
Κάπνισμα	57	58.20%	50	47.20%
Έναρξη σεξ/κων επαφών > 18	74	75.50%	78	73.60%
Σεξουαλικοί σύντροφοι > 3	56	57.10%	60	56.60%
Σύνολο	98		106	

II. Παθολογοανατομικά στοιχεία ιστολογίας κωνοειδών εκτομών

Όσον αφορά το Group A, καμιά γυναίκα δεν ανεβρέθηκε να έχει αρνητική ιστολογία ή μικροδιηθητική νόσο στην ιστολογική απάντηση του παρασκευάσματος της κωνοειδούς εκτομής. Σε 4 γυναίκες (4.1%) ανεβρέθηκαν HPV αλλοιώσεις. Στο 38.8% (38/98) η ιστολογία του κώνου έδειξε ήπια δυσπλασία (CIN1), στο 25.5% (25/98) μετρίου βαθμού δυσπλασία (CIN2), και στο 31.6% (31/98) η ιστολογική απάντηση

ήταν θετική για σοβαρού βαθμού δυσπλασία του πλακώδους επιθηλίου (CIN3) (Πίνακας 6).

Τα όρια εκτομής ήταν ελεύθερα αλλοιώσεων στο 88.8% (87/98). Στο 10.2% (10/98) η ιστολογική απάντηση των παρασκευασμάτων ήταν θετική για υπολειμματική αλλοίωση στο έσω όριο της εκτομής, ενώ σε μία γυναίκα από τις 98 (1.02%) φάνηκε να υπάρχει υπολειμματική αλλοίωση στο έξω όριο του κώνου (Πίνακας 7).

Στο Group B, σε καμία γυναίκα η ιστολογική απάντηση δεν βγήκε αρνητική, όπως επίσης σε ποσοστό 15% ανέδειξε HPV αλλοιώσεις. Σε ποσοστό 21.7% (23/106) η ιστολογία του κώνου έδειξε ήπια δυσπλασία (CIN1), σε ποσοστό 30.2% (32/106) μετρίου βαθμού δυσπλασία (CIN2), και σε 31.1% (33/106) η ιστολογική απάντηση ήταν θετική για σοβαρού βαθμού δυσπλασία του πλακώδους επιθηλίου (CIN3). Επιπλέον, σε δύο γυναίκες η απάντηση του ιστολογικού παρασκευάσματος του κώνου ανέδειξε μικροδιηθητική νόσο (1.9%) (Πίνακας 6).

Τα όρια εκτομής στο Group B ήταν ελεύθερα αλλοιώσεων στο 84.9% (90/106). Στο 13.2% (14/106) η ιστολογική απάντηση των παρασκευασμάτων ανέφερε θετικά όρια εκτομής για υπολειμματική νόσο, ενώ σε 2 γυναίκες (1.9%) φάνηκε να υπάρχει υπολειμματική αλλοίωση στο έξω όριο του κώνου (Πίνακας 7).

Πίνακας 6. Αποτελέσματα της ιστολογικής διάγνωσης των παρασκευασμάτων των κωνοειδών εκτομών

	Group A		Group B	
Negative	0	0%	0	0%
HPV	4	4.10%	8	15%
CIN 1	38	38.80%	23	21.70%
CIN 2	25	25.50%	32	30.20%
CIN 3	31	31.60%	33	31.10%
Invasion	0	0%	2	1.90%
Total	98		106	

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της κατάστασης των ορίων εκτομής των ιστολογικών παρασκευασμάτων των κωνοειδών εκτομών

	Group A		Group B	
Clear	87	88.80%	90	84.90%
Involved EctoCx	1	1%	2	1.9%
Involved EndoCx	10	10.20%	14	13.20%
Total	98		106	

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ορισμένες από τις γυναίκες στις οποίες υπήρχε υπολειμματική αλλοίωση ή υποτροπή της νόσου υποβλήθηκαν σε δεύτερη θεραπεία (LLETZ). Η απόφαση για επαναληπτική θεραπεία βασίστηκε τόσο στο αποτέλεσμα της κυτταρολογικής εξέτασης του τραχηλικού επιχρίσματος στην μετεγχειρητική εξέταση του εξαμήνου, όσο και στην κολποσκοπική εκτίμηση, συνυπολογιζόμενων πάντα και άλλων παραμέτρων όσων αφορά την ηλικία της γυναίκας καθώς επίσης, όπως προαναφέρθηκε, και την επιθυμία της για μελλοντική τεκνοποίηση, δεδομένου ότι τα νεότερα στοιχεία στη βιβλιογραφία αναφέρουν ακόμη και τετραπλασιασμό έως δεκαπλασιασμό του κινδύνου προωρότητας και τριπλασιασμό του κινδύνου περιγεννητικής θνησιμότητας σε επικείμενη κύηση μετά από επαναληπτική θεραπεία για CIN (357, 359-363, 366, 367).

III. Συμμόρφωση (Compliance) στη σύσταση για χρήση προφυλακτικού

Στη μετεγχειρητική επίσκεψη τον 6^ο μήνα μετά τη θεραπεία σε όλες τις γυναίκες του πληθυσμού της μελέτης, δόθηκε να συμπληρωθεί ένα ερωτηματολόγιο το οποίο στόχευε στην άντληση πληροφοριών σχετικά με την χρήση προφυλακτικών μετά τη θεραπεία. Το εν λόγω ερωτηματολόγιο συμπεριλάμβανε ερωτήσεις σχετικές με την σεξουαλική ενεργότητα των γυναικών, την πιθανή αλλαγή σεξουαλικού συντρόφου στο μεσοδιάστημα από τη θεραπεία, καθώς επίσης και την ποσοστιαία χρήση κατά προσέγγιση (5%) της χρήσης προφυλακτικού σε μια κλίμακα του 100. Το ερωτηματολόγιο είχε υποστεί εσωτερική αξιολόγηση, όπως προαναφέρθηκε στη παρουσίαση της μελέτης και όλες οι γυναίκες, τόσο του Group A όσο και του Group

Β το συμπλήρωσαν χωρίς καμία γυναίκα να εξαιρεθεί από τη μελέτη και την ανάλυση των αποτελεσμάτων λόγω άρνησης συμπλήρωσης αυτού.

Από την ανάλυση των ερωτηματολογίων προέκυψε πως μόνο το 22.4% (22/98) των γυναικών του Group A, δηλαδή αυτών που έλαβαν την αυστηρή σύσταση για συστηματική χρήση προφυλακτικού σε όλες τις επαφές, ακολούθησε τις οδηγίες μας και δήλωσε 100% χρήση αυτού στις σεξουαλικές επαφές. Τριάντα τρεις γυναίκες (33.7%) απάντησαν πως είχαν κάνει χρήση προφυλακτικού σε ποσοστό μεγαλύτερο του 75% των επαφών, αναφέροντας όμως την ύπαρξη και ελεύθερων επαφών. Σε περαιτέρω υποανάλυση του πληθυσμού αυτού, προέκυψε ότι η πλειονότητα αυτών που δήλωσε μικρή συμμόρφωση στη σύστασή μας, ήταν έγγαμες και γυναίκες με σταθερό σύντροφο, των οποίων ο σύντροφος δεν φάνηκε πρόθυμος να κάνει συστηματική χρήση προφυλακτικού.

Όσον αφορά το Group B, το μεγαλύτερο ποσοστό των γυναικών (85.8%) που δεν έλαβε καμία σύσταση για συστηματική χρήση προφυλακτικού, δήλωσε ποσοστιαία χρήση αυτού μικρότερη του 75%. Παρά ταύτα 15 από τις 106 γυναίκες (14.2%) δήλωσαν πως χρησιμοποίησαν προφυλακτικό σε όλες τις επαφές τους (100%), με την πλειονότητα αυτών να επικαλείται έντονο άγχος όσον αφορά τη λοίμωξη από τον ιό.

INTENTION TO TREAT ΚΑΙ PER PROCOCOL ANALΥΣΗ

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ HPV-ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟΝ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΤΥΧΑΙΟΠΟΙΗΣΗΣ

Συγκεκριμένα κατά την πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη έγινε μελέτη των εξής υποκατηγοριών του πληθυσμού:

- I. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων και των αρνητικών γυναικών στο HPV DNA test τη στιγμή της θεραπείας
- II. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων μόνο των θετικών γυναικών στο HPV DNA test, τη στιγμή της θεραπείας

- III. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων μόνο των περιπτώσεων με υγιή όρια εκτομής
- IV. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων και των αρνητικών γυναικών στο HPV DNA test τη στιγμή της θεραπείας, της χρήσης προφυλακτικού (>75%)

Στην ανάλυση των αποτελεσμάτων των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών εξαιρέθηκαν οι γυναίκες που υπήρχε, σε κάθε περίπτωση-υποανάλυση ξεχωριστά, αδυναμία σύγκρισης προεγχειρητικής και μετεγχειρητικής διαφοροποίησης του καθενός βιοδείκτη, λόγω ανεπαρκούς υλικού για την ανάλυση του συγκεκριμένου δείκτη.

I. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη, ανάλογα με την τυχαιοποίηση, συμπεριλαμβανομένων και των αρνητικών γυναικών στο HPV DNA test τη στιγμή της θεραπείας (Πίνακας 8)

α. HPV DNA test

Από τις 204 γυναίκες που συμπεριλήφθηκαν αρχικά στη μελέτη, 3 από αυτές είχαν ανεπαρκές δείγμα για ανάλυση της HPV DNA test στο Group A και 3 αντίστοιχα στο Group B, έτσι στην τελική υποανάλυση συμπεριλήφθηκαν 95 στο Group A και 103 στο Group B. Τριάντα από αυτές (31.6%) παρέμειναν θετικές στο Group A, 6 μήνες μετά τη θεραπεία, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία αυτών (68.4%) είχε αρνητικό HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση. Αντίθετα, στο Group B το 63.1% (65/103) ήταν θετικό στο HPV DNA test στο δείγμα του 6^{ου} μήνα μετεγχειρητικά και μόνο το 36.9% αρνητικό αντίστοιχα. Η διαφορά αυτή φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική (p-value = <0.0001, Chi-squared=18.438, RR=0.5 95% CI: [0.359 to 0.697], RRR=0.5, 95% CI: [0.303 to 0.641], ARR=0.315 95% CI: [0.177 to 0.437], NNT=3 95% CI: [6 to 2]).

β. Ποιοτικός προσδιορισμός του mRNA E6/E7 των HPV τύπων 16, 18, 31, 33 και 45 (NASBA test)

Σε 13 γυναίκες στο Group A και σε 11 στο Group B, το υλικό της κυτταρολογίας υγρής φάσης δεν επαρκούσε για την ανάλυση του mRNA E6 & E7 για HR-HPV τύπους 16,18,31,33 και 45 με τη μέθοδο NASBA. Έτσι συνολικά μελετήθηκαν 85 γυναίκες στο Group A και 95 στο Group B αντίστοιχα. Και σε αυτή την ανάλυση,

φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο Group A (p -value = 0.007). Συγκεκριμένα, καμία γυναίκα (0/85) δεν είχε θετικό NASBA test τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα στο Group A, ενώ στο Group B μόνο το 88.4% (84/95) είχε αρνητικό mRNA E6 & E7 test, με ποσοστό 11.6% (11/95) να εκφράζεται θετικά στην εν λόγω εξέταση την συγκεκριμένη χρονική στιγμή (Chi-squared=7.368, RR= 0.051 95% CI: [0.003 to 0.846], RRR=0.949 95% CI: [0.154 to 0.997], ARR=0.11 95% CI: [0.041 to 0.19], NNT=9 95% CI: [24 to 5]).

γ. mRNA E6 & E7 για High Risk τύπους (Flow Cytometry)

Ο υπό μελέτη πληθυσμός είχε επαρκές υλικό για την ανάλυση του mRNA E6 & E7 για HR-HPV τύπους με την μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής τόσο προεγχειρητικά (δειγματοληψία την χρονική στιγμή προ της θεραπείας), όσο και στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη τον 6^ο μήνα. Αρνητικό test είχε το 86.7% (85/98) των γυναικών του Group A και το 83% (88/106) των γυναικών στο Group B τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα, με τη διαφορά σύγκρισης μεταξύ των 2 ομάδων του πληθυσμού τυχαιοποίησης να μην παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά (p -value = 0.587). Θετικές στο εν λόγω test ήταν 13 γυναίκες (13.3%) στο Group A και 18 (17%) στο Group B αντίστοιχα (Chi-squared=0.295, RR= 0.5 95% CI: [0.359 to 0.697], RRR=0.219 95% CI: [-0.509 to 0.596], ARR=0.037 95% CI: [-0.064 to 0.136], NNT=26 95% CI: [-16 to 7]).

δ. Ανίχνευση του p16^{INK4a} αντιγόνου (CINtec® Cytology Kit)

Οκτώ από τις γυναίκες που συμπεριλήφθηκαν στο Group A δεν είχαν επαρκές υλικό κυτταρολογίας υγρής φάσης για την ανάλυση του p16^{INK4a} είτε στη δειγματοληψία της χρονικής στιγμής μηδέν (προεγχειρητικά), είτε τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα. Έτσι συνολικά μελετήθηκαν 90 γυναίκες στο Group A και 106 στο Group B αντίστοιχα. Και σε αυτή την ανάλυση, φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο Group A (p -value = 0.001). Συγκεκριμένα, μόνο 2 γυναίκες (2/90) εξέφρασαν θετικό p16^{INK4a} στο κυτταρολογικό επίχρισμα τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα στο Group A, με το 97.8% αυτών να εμφανίζει αρνητικό test, ενώ στο Group B μόνο το 81.1% (86/106) είχε αρνητικό το συγκεκριμένο test, με ποσοστό της τάξης του 18.9% (20/106) να εκφράζει θετική την εν λόγω εξέταση την συγκεκριμένη χρονική στιγμή

(Chi-squared=0.295, RR= 0.118 95% CI: [0.028 to 0.49], RRR=0.882 95% CI: [0.51 to 0.972], ARR=0.166 95% CI: [0.083 to 0.253], NNT= 6 95% CI: [12 to 4]).

Πίνακας 8. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη, ανάλογα με την τυχαιοποίηση, συμπεριλαμβανομένων και των HPV αρνητικών γυναικών τη στιγμή της θεραπείας

	Group A					Group B					Chi ²	RR	95% CI	RRR	95% CI	ARR	95% CI	NNT	95% CI	
	(+) 6m	%	(-) 6m	%	total	(+) 6m	%	(-) 6m	%	total										
HPV	30	31.6	65	68.4	95	65	63.1	38	36.9	103	<0.0001	18.438	0.5	0.359-0.697	0.5	0.303-0.641	0.315	0.177-0.437	3	6-2
NASBA	0	0	85	100	85	11	11.6	84	88.4	95	0.007	7.368	0.051	0.003-0.846	0.949	0.154-0.997	0.11	0.041-0.19	9	24-5
FLOW	13	13.3	85	86.7	98	18	17	88	83	106	0.587	0.295	0.781	0.404-1.509	0.219	-0.509-0.596	0.037	-0.064-0.136	26	-16-7
p16	2	2.2	88	97.8	90	20	18.9	86	81.1	106	0.001	11.915	0.118	0.028-0.49	0.882	0.51-0.972	0.166	0.083-0.253	6	12-4

II. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη, ανάλογα με την τυχαιοποίηση, συμπεριλαμβανομένων μόνο των θετικών γυναικών στο HPV DNA test, τη στιγμή της θεραπείας (Πίνακας 9)

α. HPV DNA test

Από τον αρχικό πληθυσμό που εντάχθηκε αρχικά στη μελέτη, 22 γυναίκες από αυτές που τυχαιοποιήθηκαν στο Group A και 15 αντίστοιχα στο Group B, εξαιρέθηκαν λόγω αρνητικής έκφρασης του συγκεκριμένου test προ της θεραπείας, ή και λόγω ανεπαρκούς δείγματος για ανάλυση του HPV DNA test. Έτσι στην τελική υποανάλυση συμπεριλήφθησαν 77 στο Group A και 91 στο Group B. Είκοσι τρεις από αυτές (29.8%) παρέμειναν θετικές στο Group A, 6 μήνες μετά τη θεραπεία, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία αυτών (70.1%) εμφάνισε αρνητικό HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση. Αντίθετα, στο Group B το 69.2% (63/91) ήταν θετικό στο HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετεγχειρητικά, και μόνο το 30.8% (28/91) αρνητικό αντίστοιχα. Η διαφορά στην ομάδα του πληθυσμού μελέτης-παρέμβασης με τη σύσταση για συστηματική χρήση προφυλακτικού κατά τις σεξουαλικές επαφές την πρώτη μετεγχειρητική περίοδο (Group A), φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική, σε σχέση με το Group B που δεν δόθηκε καμία σύσταση, πέραν των μετεγχειρητικών οδηγιών ρουτίνας (p -value = <0.0001 , $\text{Chi-squared}=24.31$, $\text{RR}=0.431$ 95% CI: [0.298 to 0.624]), $\text{RRR}=0.569$, 95% CI: [0.376 to 0.702], $\text{ARR}=0.394$ 95% CI: [0.244 to 0.518], $\text{NNT}=2$ 95% CI: [4 to 2]).

β. Ποιοτικός προσδιορισμός του mRNA E6/E7 των HPV τύπων 16, 18, 31, 33 και 45 (NASBA test)

Καμία από τις 29 γυναίκες στο Group A και μόνο 9 στις 55 (16.4%) στο Group B εξέφρασαν θετικό το mRNA E6 & E7 test για τους HR-HPV τύπους 16,18,31,33 και 45 με τη μέθοδο NASBA τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα. Η πλειονότητα αυτών, 100% στο Group A και 83.6% στο Group B είχε αρνητική τη συγκεκριμένη εξέταση, με τη στατιστική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες του πληθυσμού να μην είναι σημαντική (p -value = 0.094) ($\text{Chi-squared}=2.801$, $\text{RR}=0.122$ 95% CI: [0.007 to 2.042], $\text{RRR}=0.896$ 95% CI: [-0.725 to 0.994], $\text{ARR}=0.147$ 95% CI: [0 to 0.267], $\text{NNT}=6$ 95% CI: [-2465 to 4]).

γ. mRNA E6 & E7 για High Risk τύπους (Flow Cytometry)

Εννέα γυναίκες (19.1%) από το Group A και 11 (18.6%) από το Group B αντίστοιχα ήταν θετικές στην ανάλυση του mRNA E6 & E7 για HR-HPV τύπους με την μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα. Αρνητικά αποτελέσματα στο συγκεκριμένο test φάνηκε να έχει το 80.9% (38/47) των γυναικών του Group A και το 81.4% (48/59) των γυναικών στο Group B τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα, με τη διαφορά σύγκρισης μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων τυχαιοποίησης να μην παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά (p-value = 0.854, Chi-squared=0.034, RR= 1.027 95% CI:[0.465 to 2.27], RRR=-0.027 95% CI:[-1.27 to 0.535], ARR=-0.005 95% CI: [-0.161 to 0.141], NNT=-199 95% CI: [-6 to 7]).

δ. Ανίχνευση του p16^{INK4a} αντιγόνου (CINtec® Cytology Kit)

Το 5% των γυναικών (1/20) του Group A στο υλικό κυτταρολογίας υγρής φάσης για την ανάλυση του p16^{INK4a}, τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα, ήταν θετικό και το 22.4% (11/49) στο Group B αντίστοιχα. Η σύγκριση της μεταβλητότητας της θετικής έκφρασης του p16^{INK4a} αντιγόνου μεταξύ των 2 ομάδων φάνηκε να μην έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p-value = 0.166, Chi-squared=1.918, RR= 0.223 95% CI:[0.031 to 1.613], RRR=0.777 95% CI: [0.613 to 0.969], ARR=0.174 95% CI: [0.034 to 0.315], NNT= 5 95% CI: [-29 to 3]).

Πίνακας 9. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη, ανάλογα με την τυχαιοποίηση, συμπεριλαμβανομένων μόνο των θετικών γυναικών στο HPV DNA test, τη στιγμή της θεραπείας

	Group A				Group B				p-value	Chi ²	RR	95% CI	RRR	95% CI	ARR	95% CI	NNT	95% CI
	(+) 6m	%	(-) 6m	%	(+) 6m	%	(-) 6m	%										
	total	%	total	%	total	%	total	%										
HPV	23	29.8	54	70.1	63	69.2	28	30.8	91	<0.0001	0.431	0.298-0.624	0.569	0.376-0.702	0.394	0.244-0.518	3	6-2
NASBA	0	0	29	100	9	16.4	46	83.6	55	0.094	0.122	0.007-2.04	0.896	-0.725-0.994	0.147	0-0.267	9	24-5
FLOW	9	19.1	38	80.9	11	18.6	48	81.4	59	0.854	1.027	0.465-2.27	-0.027	-1.27-0.535	-0.005	-0.161-0.141	26	-16-7
p16	1	5	19	95	11	22.4	38	77.6	49	0.166	0.223	0.031-1.613	0.777	-0.613-0.969	0.174	-0.034-0.315	6	12-4

III. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη, ανάλογα με την τυχαιοποίηση, συμπεριλαμβανομένων μόνο των περιπτώσεων με υγιή όρια εκτομής (Πίνακας 10)

α. HPV DNA test

Στην συγκεκριμένη υποανάλυση, συμπεριλήφθηκαν 84 γυναίκες από το Group A, και 89 αντιστοίχως από το Group B. Οι υπόλοιπες γυναίκες εξαιρέθηκαν είτε λόγω εκτομής επί μη υγιών ορίων βάσει του αποτελέσματος της ιστολογικής εξέτασης του κώνου, είτε λόγω ανεπαρκούς υλικού για ανάλυση του HPV DNA test στη δειγματοληψία προ ή και μετά (6^ο μετεγχειρητικό μήνα) της θεραπείας. Είκοσι επτά από αυτές (32.1%) παρέμειναν θετικές στο Group A, 6 μήνες μετά τη θεραπεία, ενώ η πλειονότητα αυτών (67.9%), ελέγχθηκε αρνητική στο HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση. Αντίθετα, στο Group B, μόλις το 40.4% (36/89) ήταν αρνητικό στο HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετεγχειρητικά με το 59.6% (53/89) να παραμένει θετικό αντίστοιχα. Η διαφορά στη μεταβολή της θετικής έκφρασης του ελεγχόμενου στην υποανάλυση test στο intervention group (Group A), φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική, σε σχέση με το control Group (Group B) όπου δεν δόθηκε καμία σύσταση, πέραν των μετεγχειρητικών οδηγιών ρουτίνας (p -value = <0.0001, Chi-squared=11.979, RR=0.54 95% CI: [0.379 to 0.77]), RRR=0.46, 95% CI: [0.23 to 0.621], ARR= 0.274 95% CI: [0.126 to 0.406], NNT=3 95% CI: [8 to 2]).

β. Ποιοτικός προσδιορισμός του mRNA E6/E7 των HPV τύπων 16, 18, 31, 33 και 45 (NASBA test)

Καμία από τις 75 γυναίκες στο Group A δεν παρουσίασε θετικό αποτέλεσμα στο mRNA E6 & E7 test τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα. Σε αντιδιαστολή, 13.6% (11/81) στο Group B είχε θετική τη συγκεκριμένη εξέταση. Η θετική έκφραση του mRNA E6 & E7 test για τους HR-HPV τύπους 16,18,31,33 και 45 φάνηκε να μεταβάλλεται στατιστικά σημαντικά μετά από συστηματική χρήση προφυλακτικού στην μετεγχειρητική περίοδο (p -value = 0.005, Chi-squared=7.774, RR= 0.049 95% CI: [0.003 to 0.815], RRR=0.951 95% CI: [0.185 to 0.997], ARR=0.129 95% CI: [0.05 to 0.221], NNT=7 95% CI: [-20 to 4]).

γ. mRNA E6 & E7 για High Risk τύπους (Flow Cytometry)

Έντεκα από τις 87 γυναίκες (12.6%) του πληθυσμού της μελέτης που συμπεριλήφθηκαν στο Group A είχαν θετικό αποτέλεσμα στην ανάλυση του mRNA E6 & E7 για HR-HPV τύπους με την μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής στην πρώτη επίσκεψη τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα. Αρνητικό test φάνηκε να έχει το 87.4% (76/87) των γυναικών του Group A και το 83.3% (75/90) των γυναικών στο Group B τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα, με τη διαφορά σύγκρισης μεταξύ των 2 ομάδων τυχαιοποίησης να μην παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά (p-value = 0.587). Θετικές στο εν λόγω test ήταν 11 γυναίκες (12.6%) στο Group A και 15 (16.7%) στο Group B αντίστοιχα. (Chi-squared=0.295, RR= 0.759 95% CI: [0.369 to 1.559], RRR=0.241 95% CI: [-0.559 to 0.631], ARR=0.04 95% CI: [-0.066 to 0.146], NNT=24 95% CI: [-15 to 7]).

δ. Ανίχνευση του p16^{INK4a} αντιγόνου (CINtec® Cytology Kit)

Δύο μόλις από τις 80 γυναίκες (2.5%) που τυχαιοποιήθηκαν στο Group A βρέθηκαν θετικές στο υλικό κυτταρολογίας υγρής φάσης για την ανάλυση του p16^{INK4a} τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα. Οι υπόλοιπες 78 (97.5%) είχαν αρνητικό αποτέλεσμα στην προκειμένη εξέταση στη συγκεκριμένη υποαναλυόμενη πληθυσμιακή ομάδα. Στατιστικά, η σύγκριση μεταξύ της ομάδας ελέγχου (Group B) και του Group παρέμβασης (Group A) φάνηκε να έχει σημαντική διαφορά (p-value = 0.002), με ποσοστό της τάξης του 18.9% των γυναικών (17/90) του Group B να ελέγχονται θετικές για το p16^{INK4a} αντιγόνο στο κυτταρολογικό επίχρισμα τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα, και μόλις το 81.1% αυτών, σε σύγκριση του 97.5% του Group A, να έχει αρνητική έκφραση του αντιγόνου (Chi-squared=9.868, RR= 0.132 95% CI: [0.032 to 0.555], RRR=0.868 95% CI: [0.445 to 0.968], ARR=0.164 95% CI: [0.072 to 0.259], NNT= 6 95% CI: [14 to 4]).

Πίνακας 10. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη, ανάλογα με την τυχαιοποίηση, συμπεριλαμβανομένων μόνο των περιπτώσεων με υγιή όρια εκτομής

	Group A						Group B															
	(+) δ m		(-) δ m		%		total		(+) δ m		(-) δ m		%		total							
		%		%		%		%		%		%		%		%						
HPV	27	32.1	57	67.9	84	84	53	59.6	36	40.4	89	89	0.001	11.979	0.54	0.379-0.77	0.46	0.23-0.621	0.274	0.126-0.406	3	8-2
NASBA	0	0	75	100	75	75	11	13.6	70	86.4	81	81	0.005	7.774	0.049	0.003-0.815	0.951	0.185-0.997	0.129	0.05-0.221	7	20-5
FLOW	11	12.6	76	87.4	87	87	15	16.7	75	83.3	90	90	0.587	0.295	0.759	0.369-1.559	0.241	-0.559-0.631	0.04	-0.066-0.146	24	-15-7
p16	2	2.5	78	97.5	80	80	17	18.9	73	81.1	90	90	0.002	9.868	0.132	0.032-0.555	0.868	0.445-0.968	0.164	0.072-0.259	6	14-4

IV. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη, συμπεριλαμβανομένων και των αρνητικών γυναικών στο HPV DNA test τη στιγμή της θεραπείας, της χρήσης προφυλακτικού (>75%) και ανάλογα της αρχικής τυχαιοποίησης (Πίνακας 11)

α. HPV DNA test

Στην συγκεκριμένη υποανάλυση, συμπεριλήφθησαν 55/98 γυναίκες (56.1%) από αυτές που δήλωσαν στο ερωτηματολόγιο ότι χρησιμοποίησαν προφυλακτικό σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του 75% στις επαφές τους το πρώτο εξάμηνο μετά τη θεραπεία και είχαν τυχαιοποιηθεί αρχικά στο Group A, και 91/106 (85.8%) αντιστοίχως του Group B, δηλαδή, γυναίκες που βάσει του ερωτηματολογίου έκαναν χρήση προφυλακτικού μικρότερη του 75%, ανεξαρτήτως των αρχικών συστάσεων κατά τη στιγμή της θεραπείας. Μόλις 8 από αυτές (14.5%) παρέμειναν θετικές στο Group A, 6 μήνες μετά τη θεραπεία στο HPV DNA test, ενώ η πλειονότητα αυτών (85.4%), ελέγχθηκε αρνητική στο εν λόγω test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση. Αντίθετα, στο Group B, μόλις το 33% (30/91) εκφράστηκε αρνητικά στο HPV DNA test στο δείγμα του 6^{ου} μήνα μετεγχειρητικά, με το 67% (61/91) να παραμένει θετικό αντίστοιχα. Η διαφορά στη μεταβολή της θετικής έκφρασης του ελεγχόμενου στην υποανάλυση test στο Group A, φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική, σε σχέση με το Group B που δεν δόθηκε καμία σύσταση, πέραν των μετεγχειρητικών οδηγιών ρουτίνας (p -value = <0.0001, Chi-squared=35.814, RR=0.217 95% CI: [0.113 to 0.418]), RRR=0.783, 95% CI: [0.582 to 0.887], ARR= 0.525 95% CI: [0.37 to 0.637], NNT=1 95% CI: [3 to 2]).

β. Ποιοτικός προσδιορισμός του mRNA E6/E7 των HPV τύπων 16, 18, 31, 33 και 45 (NASBA test)

Καμία από τις 48 γυναίκες του Group A δεν παρουσίασε θετικό αποτέλεσμα στο mRNA E6 & E7 test τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα. Αντίθετα, το 13.1% (11/84) στο Group B είχε θετική τη συγκεκριμένη εξέταση. Η θετική έκφραση του mRNA E6 & E7 test για τους HR-HPV τύπους 16, 18, 31, 33 και 45 φάνηκε να μεταβάλλεται στατιστικά σημαντικά μετά από συστηματική χρήση προφυλακτικού στην μετεγχειρητική περίοδο (p -value = 0.04, Chi-squared=4.227, RR= 0.079 95% CI: [0.005 to 1.31], RRR=0.921 95% CI: [-0.31 to 0.995], ARR=0.121 95% CI: [0.022 to 0.21], NNT=8 95% CI: [46 to 5]).

γ. mRNA E6 & E7 για High Risk τύπους (Flow Cytometry)

Μόνο 6 από τις 58 γυναίκες (10.3%) του πληθυσμού του Group A με ποσοστό χρήσης προφυλακτικού μεγαλύτερο ή ίσο του 75% στις επαφές τους το πρώτο εξάμηνο μετά τη θεραπεία, είχαν θετικό αποτέλεσμα στην ανάλυση του mRNA E6 & E7 για HR-HPV τύπους με την μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής στην πρώτη επίσκεψη μετεγχειρητικά. Αρνητικό test είχε το 89.7% (52/58) των γυναικών του Group A και το 83% (78/94) των γυναικών στο Group B τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα, με τη διαφορά σύγκρισης μεταξύ των 2 ομάδων τυχαιοποίησης να μην παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά (p-value = 0.369). Θετικές στο εν λόγω test ήταν μόνο 16 γυναίκες (17%) από το Group B. (Chi-squared=0.809, RR= 0.608 95% CI: [0.252 to 1.464], RRR=0.392 95% CI: [-0.464 to 0.748], ARR=0.067 95% CI: [-0.055 to 0.171], NNT=14 95% CI: [-18 to 6]).

δ. Ανίχνευση του p16^{INK4a} αντιγόνου (CINtec® Cytology Kit)

Το 100% των γυναικών του Group A με συστηματική χρήση προφυλακτικού, στο υλικό κυτταρολογίας υγρής φάσης για την ανάλυση του p16^{INK4a} τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα, είχε αρνητικό αποτέλεσμα και το 19.1% (18/94) στο Group B αντίστοιχα με χρήση προφυλακτικού μικρότερη του 75%. Η σύγκριση της μεταβλητότητας της θετικής έκφρασης του p16^{INK4a} αντιγόνου μεταξύ των 2 ομάδων φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p-value = 0.003, Chi-squared=8.527, RR= 0.05 95% CI: [0.003 to 0.809], RRR=0.95 95% CI: [0.191 to 0.997], ARR=0.182 95% CI: [0.081 to 0.273], NNT= 5 95% CI: [12 to 4]).

Πίνακας 11.1. Πιθανότητα θετικής έκφρασης HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη, συμπεριλαμβανομένων και των αρνητικών γυναικών στο HPV DNA test τη στιγμή της θεραπείας, της χρήσης προφυλακτικού (>75%) και ανάλογα της αρχικής τυχαιοποίησης

	Group A					Group B					p-value	Chi ²	RR	95% CI	RRR	95% CI	ARR	95% CI	NNT	95% CI
	(+) 6m	%	(-) 6m	%	total	(+) 6m	%	(-) 6m	%	total										
HPV	8	14.5	47	85.4	55	61	67	30	33	91	<0.0001	35.814	0.217	0.113-0.418	0.783	0.582-0.887	0.525	0.37-0.637	1	3-2
NASBA	0	0	48	100	48	11	13.1	73	86.9	84	0.04	4.227	0.079	0.005-1.31	0.921	-0.31-0.995	0.121	0.022-0.21	8	46-5
FLOW	6	10.3	52	89.7	58	16	17	78	83	94	0.369	0.809	0.608	0.252-1.464	0.392	-0.464-0.748	0.067	-0.055-0.171	14	-18-6
p16	0	0	52	100	52	18	19.1	76	80.9	94	0.003	8.527	0.05	0.003-0.809	0.95	0.191-0.997	0.182	0.081-0.273	5	12-4

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΠΟΟΜΑΔΩΝ - MULTIPLE OUTCOMES AND SUBGROUP ANALYSES

Παράγοντες που επηρεάζουν τη μετεγχειρητική θετική έκφραση του HR-HPV DNA test στον υπό μελέτη πληθυσμό (Ολόκληρος ο πληθυσμός ανεξάρτητα από την τυχαιοποίηση)

Σε επιπλέον αναλύσεις που πραγματοποιήσαμε, έγινε προσπάθεια να εντοπιστούν οι διάφοροι ανεξάρτητοι παράγοντες (independent variables) που μπορούν να επηρεάσουν και να προβλέψουν την θετική έκφραση του HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση. Για την εξαγωγή αυτών των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε Logistic regression ανάλυση σε pool πληθυσμό. Έγινε συσχέτιση τόσο επιδημιολογικών και κοινωνικών παραμέτρων όπως η ηλικία άνω των 35, η τεκνοποίηση με φυσιολογικό τοκετό, το κάπνισμα, η ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών, ο αριθμός των σεξουαλικών συντρόφων (>3), η εύρεση HR-HPV προεγχειρητικά, ο βαθμός της ιστολογικής αλλοίωσης του κώνου και η κατάσταση των ορίων εκτομής, καθώς επίσης και η ύπαρξη συμμετοχής αδενικών κρυπτών στην αλλοίωση.

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την συγκεκριμένη ανάλυση έχουν ως εξής για κάθε μια ανεξάρτητη μεταβλητή:

i. Ηλικία >35 και Προεγχειρητικό HPV status (Πίνακας 12)

Η ηλικία άνω των 35 ετών καθώς επίσης και το προεγχειρητικό status του HPV φάνηκε να επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά την μετεγχειρητική κατάσταση του HPV DNA test, και να μπορούν να προβλέψουν με σχετική ακρίβεια το αποτέλεσμα αυτού. Δηλαδή, γυναίκες άνω των 35 ετών έχουν μικρότερη πιθανότητα θετικού HPV DNA test μετά τη θεραπεία σε σχέση με μικρότερες ηλικίες (OR=0.4756265, 95% CI: 0.262809 - 0.8607795), ενώ οι αρχικά θετικές HR-HPV έχουν περισσότερες πιθανότητες να παραμείνουν θετικές και 6 μήνες μετά τη θεραπεία (OR=3.001824, 95% CI: 1.378158 - 6.538396).

Πίνακας 12. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για τις ανεξάρτητες μεταβλητές α. της ηλικίας >35 και β. του προεγχειρητικού HPV status

Logistic regression		Number of obs	=	198		
		LR chi2(1)	=	15.16		
		Prob > chi2	=	0.0005		
Log likelihood = -125.17688		Pseudo R2	=	0.0571		

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	

Age>35	0.4756265	0.1439538	-2.46	0.014	0.262809	- 0.8607795
hr1	3.001824	1.192285	2.77	0.006	1.378158	- 6.538396

**ii. Τεκνοποίηση με φυσιολογικό τοκετό
(Πίνακας 13)**

Η τεκνοποίηση με φυσιολογικό τοκετό δεν φάνηκε να επηρεάζει στατιστικά σημαντικά την μετεγχειρητική κατάσταση του HPV, και συνεπώς δεν φάνηκε να έχει προγνωστική αξία στο μετεγχειρητικό status του HPV (OR=0.8941799, 95% CI: 0.4905806 - 1.629819).

Πίνακας 13. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για την ανεξάρτητη μεταβλητή της τεκνοποίησης με φυσιολογικό τοκετό

Logistic regression		Number of obs	=	202		
		LR chi2(1)	=	0.13		
		Prob > chi2	=	0.7153		
Log likelihood = -131.74763		Pseudo R2	=	0.0005		

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	

parity	0.8941799	0.2738784	-0.37	0.715	0.4905806	- 1.629819

**iii. Κάπνισμα
(Πίνακας 14)**

Παρόμοια, μη σημαντικά αποτελέσματα φάνηκε να έχει και το κάπνισμα ως ανεξάρτητη παράμετρος στη Logistic regression ανάλυση, μη αποτελώντας

προγνωστικό δείκτη θετικότητας στο μετεγχειρητικό status του HPV τον 6^ο μήνα (OR= 1.197279, 95% CI: 0.6787833 - 2.111833).

Πίνακας 14. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για την ανεξάρτητη μεταβλητή του καπνίσματος

Logistic regression		Number of obs	=	202	
		LR chi2(1)	=	0.39	
		Prob > chi2	=	0.5337	
Log likelihood = -131.74763		Pseudo R2	=	0.0014	

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
-----+-----					
smoking	1.197279	0.3466704	0.62	0.534	0.6787833 - 2.111833

**iv. Έναρξη σεξουαλικών επαφών σε ηλικία >18 ετών
(Πίνακας 15)**

Μη στατιστικά σημαντική διαφορά προέκυψε και στη Logistic regression ανάλυση της ανεξάρτητης παραμέτρου της ηλικίας άνω των 18 ετών έναρξης των σεξουαλικών επαφών. Η πρώιμη ηλικιακά έναρξη επαφών, δε φάνηκε να είναι προγνωστικός παράγοντας θετικής έκφρασης του HPV DNA test τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα (OR= 0.8313666, 95% CI: 0.4708343 - 1.46797).

Πίνακας 15. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για την ανεξάρτητη μεταβλητή της ηλικίας έναρξης των σεξουαλικών επαφών άνω των 18 ετών

Logistic regression		Number of obs	=	202	
		LR chi2(1)	=	0.41	
		Prob > chi2	=	0.5244	
Log likelihood = -131.74763		Pseudo R2	=	0.0015	

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
-----+-----					
agefsex18	0.8313666	0.2411706	-0.64	0.524	0.4708343 - 1.46797

ν. Αριθμός σεξουαλικών συντρόφων (>3)

(Πίνακας 16).

Ακολούθως, και ο αριθμός των σεξουαλικών συντρόφων (>3), ως παράμετρος πρόβλεψης του μετεγχειρητικού status του HPV τον 6^ο μήνα μετά τη θεραπεία, δεν φάνηκε να έχει σημαντικότητα, μιας και εδώ τα όρια του Odds Ratio φάνηκε να τέμνουν τη γραμμή της μονάδος ((OR= 1.081069, 95% CI: 0.6047948 - 1.932407). Επεξηγηματικά, οι γυναίκες με περισσότερους των τριών σεξουαλικούς συντρόφους δεν διατρέχουν περισσότερες πιθανότητες να είναι θετικές στο HPV DNA test τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα.

Πίνακας 16. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για την ανεξάρτητη μεταβλητή του αριθμού των σεξουαλικών συντρόφων (>3)

Logistic regression		Number of obs	=	202	
		LR chi2(1)	=	0.07	
		Prob > chi2	=	0.7926	
Log likelihood = -131.74763		Pseudo R2	=	0.0003	

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]

Sexpart>3p	1.081069	0.3203642	0.26	0.793	0.6047948 - 1.932407

vi. Υψηλόβαθμη αλλοίωση (CIN2+)

(Πίνακας 17)

Η υψηλόβαθμη αλλοίωση (CIN2+) στο ιστολογικό παρασκεύασμα του κώνου, ως ανεξάρτητη παράμετρος πρόβλεψης της θετικής έκφρασης του HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση, φάνηκε να μην έχει ισχυρή προγνωστική αξία, στην ανίχνευση θετικού HPV DNA test, μιας και τα όρια εμπιστοσύνης του Odds Ratio φάνηκε να τέμνουν τη γραμμή της μονάδος (OR= 1.025283, 95% CI: 0.5751176 - 1.82781).

Πίνακας 17. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για την ανεξάρτητη μεταβλητή της υψηλόβαθμης ιστολογικά αλλοίωσης (CIN2+)

Logistic regression		Number of obs	=	202	
		LR chi2(1)	=	0.01	
		Prob > chi2	=	0.9325	
Log likelihood = -131.74763		Pseudo R2	=	0.0000	

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
-----+-----					
CIN2	1.025283	0.3024379	0.08	0.933	0.5751176 - 1.82781

vii. Όρια εκτομής

(Πίνακας 18)

Η ανεξάρτητη παράμετρος των υγιών ορίων εκτομής, στη Logistic regression ανάλυση φάνηκε να μη συμπεριφέρεται ως αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης θετικής έκφρασης του HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση. Με άλλα λόγια, οι γυναίκες με εξαίρεση της αλλοίωσης υπό υγιή όρια δεν είναι απαραίτητο ότι θα ελεγχθούν αρνητικές στο HPV DNA test τον 6^ο μετεγχειρητικό μήνα. Τα όρια εμπιστοσύνης του Odds Ratio και στη συγκεκριμένη ανάλυση έδειξαν διακύμανση που διαπερνά τη μονάδα προσδίδοντας μη στατιστική σημαντικότητα στην παράμετρο που ελέγχθηκε (OR= 1.038961, 95% CI: 0.1697012 – 6.360828).

Πίνακας 18. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για την ανεξάρτητη μεταβλητή των ορίων εκτομής της αλλοίωσης

Logistic regression		Number of obs	=	202	
		LR chi2(1)	=	0.39	
		Prob > chi2	=	0.5337	
Log likelihood = -131.74763		Pseudo R2	=	0.0014	

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
-----+-----					
Margins	1.038961	0.9604933	0.04	0.967	0.1697012 - 6.360828

viii. Συμμετοχή αδενικών κρυπτών

(Πίνακας 19)

Η μη συμμετοχή των αδενικών κρυπτών στην αλλοίωση σύμφωνα με την ιστολογική διάγνωση, δε φάνηκε να χρησιμεύει προγνωστικά, παρόλο που η συμμετοχή αυτών αποτελεί παράγοντα κινδύνου θεραπευτικής αποτυχίας. Μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα προέκυψαν και σε αυτή την υποανάλυση με το Odds Ratio να ισούται με 3.226667 και όρια εμπιστοσύνης 95% CI: 0.5768496 - 18.04869.

Πίνακας 19. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για την ανεξάρτητη μεταβλητή της συμμετοχής των αδενικών κρυπτών στην αλλοίωση

Logistic regression		Number of obs	=	202	
		LR chi2(1)	=	0.00	
		Prob > chi2	=	0.9671	
Log likelihood = -131.74763		Pseudo R2	=	0.0000	

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]

Crypt	3.226667	2.834289	1.33	0.182	0.5768496 - 18.04869

ix. Μετεγχειρητική χρήση προφυλακτικού

(Πίνακας 20)

Η χρήση προφυλακτικού σε ποσοστό 100%, όταν εξετάστηκε σαν ξεχωριστή προγνωστική παράμετρος στην πρόγνωση θετικού αποτελέσματος στο HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση, φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Με άλλα λόγια, γυναίκες που δεν χρησιμοποίησαν προφυλακτικό σε όλες τις επαφές έχουν πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα, με στατιστικά σημαντική διαφορά, να εκφράζουν θετικό το HPV DNA test σε σχέση με αυτές που έκαναν συστηματική χρήση (OR= 0.3090909, 95% CI: 0.1698335 - 0.5625345).

Πίνακας 20. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για την ανεξάρτητη μεταβλητή της χρήσης προφυλακτικού μετεγχειρητικά

Logistic regression		Number of obs	=	202	
		LR chi2(1)	=	0.39	
		Prob > chi2	=	0.5337	
Log likelihood = -131.74763		Pseudo R2	=	0.0014	

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
-----+-----					
Condom	0.3090909	0.0944348	-3.84	0.000	0.1698335 - 0.5625345

Παράγοντες που επηρεάζουν τη μετεγχειρητική θετική έκφραση του HR-HPV DNA test (ATP analysis). Επικεντρωμένη ανάλυση στον πληθυσμό Control της μελέτης χωρίς χρήση προφυλακτικού και γυναίκες από το Intervention Group με χρήση προφυλακτικού 75%

Έγινε επίσης Logistic regression ανάλυση στις γυναίκες που συμπεριλήφθηκαν στο Group B και δήλωσαν στο ερωτηματολόγιο πως είχαν μηδενική ποσοστιαία χρήση προφυλακτικού στις σεξουαλικές επαφές. Οι γυναίκες αυτές συγκρίθηκαν με εκείνες του Group A που δήλωσαν στο ερωτηματολόγιο πως είχαν χρησιμοποιήσει προφυλακτικό σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του 75% (Πίνακας 21).

Τα συμπεράσματα που ανάγονται από την συγκεκριμένη ανάλυση είναι: α. Γυναίκες υπαγόμενες στο Group B και με μηδενική χρήση προφυλακτικού έχουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα να παραμείνουν θετικές για HR-HPV υπότυπο 6 μήνες μετά τη θεραπεία, συγκριτικά με τις γυναίκες που τυχαιοποιήθηκαν στο Group A αλλά χρησιμοποίησαν προφυλακτικό στις επαφές τους σε ποσοστό μεγαλύτερο του 75% (OR=3.794732, 95% CI: 1.269913 - 11.33935). β. Η τυχαιοποίηση διαδραματίζει στατιστικά σημαντικό ρόλο στην αρνητικοποίηση του HR-HPV 6 μήνες μετά τη θεραπεία δηλαδή επιβεβαιώνει για άλλη μια φορά πως η χρήση προφυλακτικού επάγει την κάθαρση του ιού. Οι γυναίκες που συμπεριλήφθηκαν στο Intervention Group φαίνεται να ωφελούνται περισσότερο αυτών που δεν έλαβαν σύσταση για συστηματική χρήση προφυλακτικού μετεγχειρητικά (OR=0.1172449, 95% CI: 0.47942 - 0.2867287) γ. Η ηλικία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην πιθανότητα θετικού HR-HPV DNA test μετά τη

θεραπεία. Γυναίκες άνω των 35 ετών και αρχικά θετικές για HR-HPV που δεν χρησιμοποίησαν προφυλακτικό έχουν πολύ περισσότερες πιθανότητες να παραμείνουν θετικές και 6 μήνες μετά τη θεραπεία συγκρινόμενες με γυναίκες μικρότερης ηλικίας (OR=0.2292952, 95% CI: 0.986001 - 0.5332276).

Πίνακας 21. Αποτελέσματα από τη Logistic regression ανάλυση για τις ανεξάρτητες μεταβλητές α, του προεγχειρητικού HPV status β. του Group τυχαιοποίησης γ. της ηλικίας >35

Logistic regression		Number of obs	=	138	
		LR chi2(1)	=	47.20	
		Prob > chi2	=	0.0000	
Log likelihood = -69.588764		Pseudo R2	=	0.2533	

hr2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]

hr1	3.794732	2.119407	2.39	0.017	1.269913 11.33935
arm	.1172449	.0534953	-4.70	0.000	.047942 .2867287
age35	.2292952	.0987319	-3.42	0.001	.0986001 .5332276

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΤΗΤΑΣ HPV-ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΑΠΟΤΥΧΙΕΣ

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μελέτης, όπως αναφέρθηκε ο υπό μελέτη πληθυσμός συνέχισε τη μετεγχειρητική παρακολούθηση για διάστημα μεγαλύτερο των 24 μηνών, αρχικά σε εξάμηνη βάση έως τη συμπλήρωση 2 ετών από τη θεραπεία και ανά 12 μήνες στη συνέχεια. Σε κάθε επίσκεψη γινόταν λήψη υλικού κυτταρολογίας υγρής φάσης, τόσο για κυτταρολογική εξέταση, όσο και για την περαιτέρω ανάλυση των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών.

Συνολικά, με την συμπλήρωση τεσσάρων και πλέον ετών παρακολούθησης, στον πληθυσμό της μελέτης είχαμε 12 περιστατικά (5.88%) τα οποία χρειάστηκε να υποβληθούν σε δεύτερη θεραπεία μετά το σύμφωνο αποτέλεσμα τόσο της κυτταρολογικής όσο και της κολποσκοπικής εξέτασης. Το ποσοστό αυτό (5.88%) πρέπει να τονιστεί πως είναι εντός των ορίων (<7.5%) που θέτουν τα παγκόσμια δεδομένα εσωτερικής αξιολόγησης (AUDIT) (254). Από αυτές τις 12 γυναίκες οι 5 προερχόταν από το Group A, και οι υπόλοιπες 7 από το Group B. Με την συμπλήρωση του πρώτου εξαμήνου σε επαναληπτική θεραπεία υποβλήθηκαν 3 γυναίκες. Δύο γυναίκες προερχόταν από το Group A και μία από το Group B. Η παθολογοανατομική έκθεση του πρώτου κώνου, και στις 3 περιπτώσεις, ανέφερε πως η αλλοίωση είχε εξαιρεθεί επί μη υγιών ορίων. Εντούτοις, σε καμία γυναίκα δεν αναδείχτηκε μεγαλύτερης βαθμίδος αλλοίωση από αυτή των απλών HPV αλλοιώσεων και CIN1 στην ιστολογία του 2^{ου} κώνου.

Επομένως, αυτές οι περιπτώσεις, δε συμπεριλαμβάνονται ουσιαστικά στα περιστατικά των θεραπευτικών αποτυχιών, δεδομένου ότι ως θεραπευτική αποτυχία ορίζεται η ανεύρεση CIN2+ αλλοίωσης στη παθολογοανατομική έκθεση του 2^{ου} κώνου, ή και CIN1, μόνο στις περιπτώσεις που η απόφαση για κωνοειδή εκτομή κατά την πρώτη θεραπεία έγινε για χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση και τέτοια περίπτωση δεν είχαμε στην μελέτη.

Στους 12 μήνες από το πέρας της πρώτης επέμβασης, σε 2^η κωνοειδή εκτομή υποβλήθηκαν 5 συνολικά γυναίκες. Δύο εξ αυτών υπάγονταν στο Group A της αρχικής τυχαιοποίησης και 3 γυναίκες στο Group B. Η ιστολογία του 2^{ου} κώνου ανέδειξε αλλοιώσεις CIN2 στις δύο γυναίκες του Group A και στις 2 από τις 3

γυναίκες του Group B και CIN3 σε μία γυναίκα υπαγόμενη στο ίδιο Group (Πίνακας 22). Όλες τους είχαν εξαιρεθείσα αλλοίωση επί μη υγιών ορίων στον 1^ο κώνο (HPV αλλοιώσεις πλησίον του έσω ορίου εκτομής), ενώ για τις γυναίκες του Group A καμία τους δεν είχε χρησιμοποιήσει προφυλακτικό στην μετεγχειρητική περίοδο, όπως είχαν δηλώσει κατά τη συμπλήρωση του ερωτηματολογίου. Μη χρήση προφυλακτικού δήλωσε και το 100% των 3 γυναικών του Group B με θεραπευτική αποτυχία τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

Πίνακας 22. Αποτελέσματα ιστολογικής διάγνωσης επαναληπτικής θεραπείας στους 12 μήνες

Histology	Group A		Group B	
	No	Percentage	No	Percentage
Negative	0	0%	0	0%
HPV	0	0%	0	0%
CIN 1	0	0%	0	0%
CIN 2	2	100%	2	66.60%
CIN 3	0	0%	1	33.30%
Invasion	0	0%	0	0%
Total	2		3	

Στη συνέχεια έγινε υπολογισμός των παραμέτρων αξιοπιστίας (Accuracy Parameters: Sensitivity, Specificity, PPV, NPV, Positive & negative LR) για κάθε HPV-σχετιζόμενο βιοδείκτη που αναλύθηκε (HPV DNA test, HR-HPV DNA, mRNA E6 & E7 με την μεθοδολογία NASBA και με Flow cytometry καθώς και το p16), και υπολογίστηκε ξεχωριστά η προγνωστική του αξία στην ανίχνευση ή μη της θεραπευτικής αποτυχίας στις 5 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε επαναληπτική θεραπεία στους 12 μήνες μετεγχειρητικά.

Το HPV DNA test φάνηκε να έχει ευαισθησία στην αναγνώριση των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων της τάξης του 70% (Sensitivity=70% 95% CI: 0.299 - 0.927) και αντίστοιχο PPV=70% (95% CI: 0.027 - 0.802) με χαμηλή ειδικότητα (Specificity=25%, 95% CI: 0.027 - 0.802). Το HR-HPV DNA εμφάνισε λίγο μεγαλύτερη ευαισθησία 75% και PPV=90% (95% CI: 0.463 - 0.989), ενώ το test με την υψηλότερη ειδικότητα, δηλαδή, την ανίχνευση των γυναικών με χαμηλόβαθμη δυσπλασία, φάνηκε να έχει η εξέταση του mRNA E6 & E7: α. με την μεθοδολογία NASBA (Specificity=90%, 95%

CI: 0.463 - 0.989), και β. με το Flow cytometry (Specificity=87.5%, 95% CI: 0.396 - 0.987). Το p16 είχε χαμηλή ευαισθησία (Sensitivity=50%) όσο και ειδικότητα (Specificity=62.5%) στην ανίχνευση των CIN2+ αλλοιώσεων για τα περιστατικά των θεραπευτικών αποτυχιών με τη συμπλήρωση του 1^{ου} έτους μετεγχειρητικής παρακολούθησης (Πίνακας 23).

Πίνακας 23. Accuracy Parameters για την ανίχνευση θεραπευτικών αποτυχιών (CIN 2+) στους 12 μήνες

	FP	TP	TN	FN	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	PPV	95% CI	NPV	95% CI	LR+	95% CI	LR-	95% CI
HPV DNA	1	3	0	1	0.7	0.299-0.927	0.25	0.027-0.802	0.7	0.027-0.802	0.25	0.027-0.802	0.933	0.349-2.498	1.2	0.077-18.745
HR HPV	0	4	0	1	0.75	0.365-0.94	0.5	0.055-0.945	0.9	0.055-0.945	0.25	0.027-0.802	1.5	0.2-11.236	0.5	0.045-5.514
NASBA	0	1	4	0	0.75	0.198-0.973	0.9	0.463-0.989	0.75	0.463-0.989	0.9	0.198-0.973	7.5	0.48-117.157	0.278	0.025-3.118
FLOW	0	1	3	1	0.5	0.125-0.875	0.875	0.396-0.987	0.75	0.198-0.973	0.7	0.299-0.927	4	0.236-67.712	0.571	0.174-1.88
P16	1	1	2	1	0.5	0.125-0.875	0.625	0.219-0.908	0.5	0.219-0.908	0.625	0.219-0.908	1.333	0.244-7.279	0.8	0.205-3.125

Με την συμπλήρωση 18 μηνών από τη θεραπεία, καμία γυναίκα δεν χρειάστηκε να υποβληθεί σε επαναληπτική θεραπεία διότι τόσο η κυτταρολογία όσο και η κολποσκοπική διάγνωση δεν συνηγορούσαν υπέρ υψηλόβαθμης αλλοίωσης. Δύο χρόνια μετά το πέρας της πρώτης επέμβασης (24 μήνες), χρειάστηκε να υποβληθούν σε 2^η κωνοειδή εκτομή 4 γυναίκες, μία από το Group A της αρχικής τυχαιοποίησης και 3 από το Group B. Η ιστολογία του 2ου κώνου ανέδειξε αλλοιώσεις CIN2 στη μία γυναίκα του Group A και στις 2 από τις 3 γυναίκες του Group B, ενώ έδειξε CIN3 στη μία γυναίκα του Group B (Πίνακας 24). Σε όλες η εξαιρεθείσα αλλοίωση του 1^{ου} κώνου ήταν επί υγιών ορίων, ενώ η γυναίκα η οποία ανήκε στο Group A δεν είχε χρησιμοποιήσει προφυλακτικό στην μετεγχειρητική περίοδο όπως δήλωσε στη συμπλήρωση του ερωτηματολογίου. Μη συστηματική χρήση προφυλακτικού δήλωσε επίσης και το σύνολο των 3 γυναικών του Group B με θεραπευτική αποτυχία την συγκεκριμένη χρονική στιγμή (24 μήνες).

Πίνακας 24. Αποτελέσματα ιστολογικής διάγνωσης επαναληπτικής θεραπείας στους 24 μήνες

Histology	Group A		Group B	
	No	Percentage	No	Percentage
Negative	0	0%	0	0%
HPV	0	0%	0	0%
CIN 1	0	0%	0	0%
CIN 2	1	100%	2	66.60%
CIN 3	0	0%	1	33.30%
Invasion	0	0%	0	0%
Total	1		3	

Βασιζόμενοι στα δεδομένα των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών κατά τη χρονική στιγμή της επαναληπτικής θεραπείας στους 24 μήνες, και σε αυτές τις 4 γυναίκες έγινε υπολογισμός των παραμέτρων αξιοπιστίας στην ανίχνευση των θεραπευτικών αποτυχιών για κάθε HPV-σχετιζόμενο βιοδείκτη ξεχωριστά.

Το HPV DNA test φάνηκε να έχει ευαισθησία στην αναγνώριση των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων της τάξης του 70% (Sensitivity=70% 95% CI: 0.299 - 0.927) και PPV=87.5% (95% CI: 0.396 - 0.987) με μέτρια ειδικότητα (Specificity=50%, 95% CI: 0.055 - 0.945). Το HR-HPV DNA test εμφάνισε την υψηλότερη ευαισθησία στον

προσδιορισμό των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων (90%), και αντίστοιχο PPV (PPV=90%, 95% CI: 0.463 - 0.989), ενώ το test με την υψηλότερη ειδικότητα στην ανίχνευση γυναικών με χαμηλότερου βαθμού δυσπλασία από CIN2, ήταν το NASBA (Specificity=87.5%, 95% CI: 0.396 - 0.987). Η ανίχνευση του mRNA E6 & E7 με την μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής (Flow cytometry) όσο και το p16 φάνηκαν να επιτυγχάνουν μέτρια ευαισθησία (Sensitivity=50%, 95% CI: 0.125 - 0.875), και αρκετά υψηλή ειδικότητα (Specificity=83.3%, 95% CI: 0.31 - 0.982) στην ανίχνευση των CIN2+ αλλοιώσεων για τα περιστατικά των θεραπευτικών αποτυχιών με τη συμπλήρωση της διαιτίας από την επέμβαση (Πίνακας 25).

Ο υπό μελέτη πληθυσμός έχει συμπληρώσει 36 μήνες μετεγχειρητικής παρακολούθησης. Εβδομήντα εννέα γυναίκες από το Group A και 92 αντίστοιχα από το Group B έχουν συμπληρώσει 48 μήνες παρακολούθησης, ενώ 48 γυναίκες του Group A και 56 γυναίκες από το Group B έχουν συμπληρώσει 5 έτη μετεγχειρητικής παρακολούθησης. Στις μετεγχειρητικές επισκέψεις των 36, 48 και 60 μηνών παρά το γεγονός ότι σε κάποιες από τις γυναίκες εμφανίζονται νέες λοιμώξεις, σε καμία από αυτές η κυτταρολογική και η κολποσκοπική εξέταση δεν συνηγορούν υπέρ υψηλόβαθμων αλλοιώσεων.

Στατιστικά σημαντική λοιπόν φάνηκε να είναι και η μείωση των θεραπευτικών αποτυχιών που σημειώθηκε στον πληθυσμό του intervention Group (Group A), σε σχέση με το Group B (Πίνακας 26). Η συστηματική χρήση προφυλακτικού στις σεξουαλικές επαφές των γυναικών που έλαβαν τη σύσταση αυτή (Group A) φάνηκε, εκτός της μείωσης της πιθανότητας θετικής έκφρασης του HPV DNA test των υπόλοιπων HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, να μειώνει στατιστικά σημαντικά και την πιθανότητα θεραπευτικών αποτυχιών στο Group A (p-value = 0.001)(Chi-squared = 10.947, RR = 1.032 RRR = -0.032, 95% CI:[-0.887 to 0.436], ARR = -0.03, 95% CI:[-0.788 to 0.748], NNT = -34, 95% CI:[-1 to 1]).

Πίνακας 25. Accuracy Parameters για την ανίχνευση θεραπευτικών αποτυχιών (CIN 2+) στους 24 μήνες

	FP	TP	TN	FN	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	PPV	95% CI	NPV	95% CI	LR+	95% CI	LR-	95% CI
HPV DNA	1	3	0	1	0.7	0.299-0.927	0.5	0.055-0.945	0.875	0.396-0.987	0.25	0.027-0.802	1.4	0.182-10.791	0.6	0.056-6.442
HR HPV	0	4	0	1	0.9	0.463-0.989	0.5	0.055-0.945	0.9	0.463-0.989	0.5	0.055-0.945	1.8	0.248-13.058	0.2	0.008-5.313
NASBA	0	1	4	0	0.75	0.198-0.973	0.875	0.396-0.987	0.75	0.198-0.973	0.875	0.396-0.987	6	0.398-90.487	0.286	0.025-3.242
FLOW	0	1	3	1	0.5	0.125-0.875	0.833	0.31-0.982	0.75	0.198-0.973	0.625	0.219-0.908	3	0.188-47.963	0.6	0.174-2.073
P16	1	1	2	1	0.5	0.125-0.875	0.833	0.31-0.982	0.75	0.198-0.973	0.625	0.219-0.908	3	0.188-47.963	0.6	0.174-2.073

Πίνακας 26. Υπολογισμός διαφοράς συχνότητας θεραπευτικών αποτυχιών μεταξύ του intervention και control Group

Group A		Group B		Chi ²	p-value	RR	RRR	95% CI	ARR	95% CI	NNT	95% CI
No Disease	Tfs	No Disease	Tfs									
97% (95/98)	3% (3/98)	94% (100/106)	6% (6/106)	10.947	0.001	1.032	-0.032	0.564-1.887	-0.03	-0.887-0.436	-34	-1-1

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε μια προσπάθεια προσέγγισης και ερμηνείας των κύριων κλινικών αποτελεσμάτων της παρούσας τυφλής τυχαιοποιημένης μελέτης, φαίνεται ότι με τη συστηματική χρήση προφυλακτικού, υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση της θετικότητας τόσο του HPV DNA test όσο και άλλων HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών μετά από θεραπεία για ενδοεπιθηλιακές τραχηλικές αλλοιώσεις.

Όπως διαφαίνεται, η κλινική σημασία του παραπάνω αποτελέσματος αποκτά ιδιαίτερη ισχύ, αφού η μείωση της θετικότητας των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών και η πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας επηρεάζεται από αυτή την τροποποίηση της σεξουαλικής συμπεριφοράς και μάλιστα για σύντομο χρονικό διάστημα μετεγχειρητικά.

Απαραίτητη προϋπόθεση στην εξαγωγή των συμπερασμάτων της παρούσας μελέτης, υπήρξε η γνώση της συμπεριφοράς και έκφρασης των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών και του πιθανού ρόλου αυτών, τόσο στην παρακολούθηση και διαλογή (triage) γυναικών με παθολογική κυτταρολογία, όσο και στη διαλογή αυτών με πιθανή δυναμική υποτροπής της νόσου μετά από θεραπεία για τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία.

Στη περίπτωση του HPV DNA test το εύρημα αυτό φαίνεται να είναι αναμενόμενο αφού η κλινική του σημασία στην ανίχνευση θεραπευτικών αποτυχιών έχει ήδη τεκμηριωθεί επαρκώς σε προγενέστερες μελέτες (test of cure) (158, 317). Αντίθετα, στις ίδιες μελέτες δεν φαίνεται να υπάρχει επαρκής τεκμηρίωση για το ρόλο της ανίχνευσης του mRNA ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 του ιού καθώς και της πρωτεΐνης p16, κατά τη μετεγχειρητική περίοδο. Απάντηση στο ερώτημα αυτό δόθηκε από μελέτη της ομάδας μας (Valasoulis G. et al. 2011), από την οποία προκύπτει πως η ίδια η θεραπεία μπορεί να μειώσει τη μετεγχειρητική θετικότητα όλων των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, βασιζόμενη για την επεξήγηση των αποτελεσμάτων, στην υπόθεση ότι η ίδια η αφαίρεση του τραχηλικού ιστού, ο οποίος εμπεριέχει και την πλειονότητα των προσβεβλημένων κυττάρων από τον ιό, οδηγεί τελικά και σε μείωση του ιικού φορτίου (368). Επιπρόσθετα, η ίδια μελέτη καταλήγει, πως η χρήση είτε μεμονωμένων HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, είτε ποικίλων συνδυασμών αυτών στο πλαίσιο ενός εξατομικευμένου συστήματος αξιολόγησης αθροιστικού

κινδύνου «Scoring System», θα μπορούσε να οδηγήσει σε ακριβέστερη ανίχνευση και πρόβλεψη μελλοντικών θεραπευτικών αποτυχιών, αποκτώντας ιδιαίτερη κλινική σημασία στο πλαίσιο οργανωμένων συστημάτων υγείας.

Στον ίδιο ερευνητικό άξονα, η ομάδα μας, με μία ακόμη δημοσίευση (Valasoulis G. et al. 2013), ενισχύει τη κλινική σημασία ενός τέτοιου εξατομικευμένου συστήματος αξιολόγησης, καταδεικνύοντας και τη γραμμική συσχέτιση της θετικότητας των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, με το βαθμό της ιστολογικά επιβεβαιωμένης τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (369).

Επεκτείνοντας την έρευνα στο πλαίσιο ανάπτυξης ενός εξατομικευμένου συστήματος αξιολόγησης αθροιστικού κινδύνου, στην παρούσα μελέτη και από την ανάλυση των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών σε γυναίκες που έκαναν συστηματική χρήση προφυλακτικού μετεγχειρητικά, φάνηκε ότι στον 6^ο μήνα μετά τη θεραπεία, οι γυναίκες οι οποίες είχαν θετικό HPV DNA test τη στιγμή της θεραπείας παρέμειναν αρνητικές στο ίδιο test μετεγχειρητικά, σε ποσοστό 68.4% ($p < 0.0001$), ενώ το ποσοστό αυτό έφτανε το 100% στην περίπτωση ανίχνευσης του mRNA E6 και E7 για τους 5 HR-HPV τύπους (16, 18, 33, 31 και 45) υπολογιζόμενο με το NASBA test ($p = 0.007$). Σε υποανάλυση των HPV DNA θετικών γυναικών, φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αρνητικοποίηση του ίδιου test, 6 μήνες μετεγχειρητικά, σε υψηλότερο ακόμη ποσοστό (70.1%) ($p < 0.0001$). Όταν μάλιστα, μελετήθηκε η ομάδα των γυναικών με χρήση προφυλακτικού μεγαλύτερη του ποσοστού του 75% και θετικό HPV DNA test προεγχειρητικά, ανιχνεύθηκε περαιτέρω αύξηση του ποσοστού αρνητικοποίησης όλων των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, και ειδικότερα του HPV DNA test, της τάξεως περίπου του 17% τον 6ο μετεγχειρητικό μήνα.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι στις γυναίκες στις οποίες έγινε εκτομή του τραχηλικού ιστού επί υγιών ορίων και ακολούθησε συστηματική χρήση προφυλακτικού, ανιχνεύθηκε υψηλό ποσοστό αρνητικοποίησης των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών (αρνητικό HPV DNA test: 67.9% και αρνητικό p16: 97.5%), φτάνοντας το 100% στην περίπτωση της ανίχνευσης του mRNA E6 και E7 για τους 5 HR HPV τύπους (16, 18, 33, 31 και 45) υπολογιζόμενο με το NASBA test.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, από τις αναλύσεις των περιστατικών με θεραπευτική αποτυχία, διαφαίνεται ότι το HR-HPV DNA test έχει την υψηλότερη

ευαισθησία στον προσδιορισμό των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων (90%), ενώ το test με την υψηλότερη ειδικότητα στην ανίχνευση γυναικών με χαμηλότερου βαθμού δυσπλασία από CIN2, φάνηκε να είναι το mRNA E6 και E7 για τους 5 HR HPV τύπους (16, 18, 33, 31 και 45) υπολογιζόμενο με το NASBA test (87.5%). Παρόμοια, υψηλή ειδικότητα (83.3%) ανιχνεύτηκε και στην περίπτωση της χρήσης ανοσοϊστοχημείας προσδιορισμού του p16 όσον αφορά τον εντοπισμό των CIN2+ αλλοιώσεων για τα περιστατικά των θεραπευτικών αποτυχιών με τη συμπλήρωση της διαιτίας από την επέμβαση. Αξιοσημείωτη είναι και η υπολογιζόμενη ειδικότητα στην ανίχνευση του mRNA E6 και E7 με τη μεθοδολογία NASBA, η οποία φαίνεται να αγγίζει το ποσοστό του 90%, όσον αφορά την ανίχνευση των γυναικών με χαμηλόβαθμη δυσπλασία με τη συμπλήρωση του 1^{ου} έτους μετεγχειρητικής παρακολούθησης. Τα παραπάνω ευρήματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μελλοντικά το εφαλτήριο εξέλιξης και εμπλουτισμού των χρησιμοποιούμενων διαγνωστικών εργαλείων στην πρόωπη ανίχνευση των θεραπευτικών αποτυχιών μετά από θεραπεία για τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις.

Παρά τα υπάρχοντα επιστημονικά δεδομένα όσον αφορά τις πιθανές επιμέρους παραμέτρους οι οποίες θα μπορούσαν να προβλέψουν την έκφραση των διαφόρων HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών μετεγχειρητικά, η συμβολή της πλειονότητας των ανεξάρτητων αυτών μεταβλητών δεν επιβεβαιώθηκε στη παρούσα μελέτη.

Ειδικότερα, από την ανάλυση των παραμέτρων που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση παλινδρόμησης ανεξάρτητων μεταβλητών (Logistic regression analysis), φαίνεται ότι τόσο η υψηλόβαθμη αλλοίωση (CIN2+) στο ιστολογικό παρασκεύασμα του κώνου, όσο και η συμμετοχή των αδενικών κρυπτών στην αλλοίωση, καθώς και η εκτομή αυτής επί μη υγιών ορίων, δε μπορούν να αποτελέσουν αξιόπιστους προγνωστικούς δείκτες θετικής έκφρασης του HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση. Επιπλέον, στην ίδια υποανάλυση (Logistic regression analysis), ανεξάρτητες μεταβλητές όπως τα επιδημιολογικά στοιχεία (π.χ. ηλικία, τεκνοποίηση με φυσιολογικό τοκετό), οι κοινωνικές συμπεριφορές (π.χ. κάπνισμα) και το σεξουαλικό ιστορικό των γυναικών που μελετήθηκαν (π.χ. ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών, αριθμός σεξουαλικών συντρόφων >3), φαίνεται και αυτές να έχουν μειωμένη προγνωστική αξία στη θετική έκφραση του HPV DNA test τον 6^ο μήνα μετά την επέμβαση. Αξιοσημείωτο είναι το αποτέλεσμα της παρούσας

ανάλυσης για την ηλικιακή ομάδα των γυναικών άνω των 35 ετών όπου φάνηκε πως η ηλικία, ως ανεξάρτητη παράμετρος, μπορεί να επηρεάσει το status του HPV και το μετεγχειρητικό θετικό αποτέλεσμα του HPV DNA test, εμφανίζοντας μικρότερη πιθανότητα θετικοποίησής του μετά τη θεραπεία σε σχέση με μικρότερες ηλικίες. Παράλληλα, στην ίδια ηλικιακή ομάδα (>35 ετών) και στις γυναίκες που ήταν θετικές προεγχειρητικά για HR-HPV υπότυπο, φαίνεται ότι ο κίνδυνος θετικού αποτελέσματος για το ίδιο test μετεγχειρητικά παραμένει υψηλός. Τέλος, φάνηκε πως ανεξάρτητα από την κατάσταση των ορίων εκτομής, η εμμονή της HPV DNA θετικότητας μετεγχειρητικά, σχετίζεται σε σημαντικότερο βαθμό με πιθανή HPV επαναλοίμωξη από τον σεξουαλικό σύντροφο, παρά με τη παρουσία υπολειμματικής αλλοίωσης μετά τη θεραπεία.

Ως πιθανές εξηγήσεις της επίδρασης της χρήσης προφυλακτικού στην έκφραση των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών μετεγχειρητικά, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε την αποφυγή νέων λοιμώξεων με νέους διαφορετικούς HPV τύπους, την επαναλοίμωξη από τον ίδιο HPV τύπο από το σεξουαλικό σύντροφο, καθώς και την επιτάχυνση της κάθαρσης της υπολειμματικής HPV λοίμωξης. Επομένως, η χρήση των προφυλακτικών φαίνεται να αυξάνει στατιστικά σημαντικά την αρνητικοποίηση των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών μετεγχειρητικά και επομένως μειώνει στατιστικά σημαντικά τις θεραπευτικές αποτυχίες είτε αυτές αφορούν υπολειμματική νόσο, ή ακόμη επανεμφανιζόμενη νόσο.

Οι παραπάνω υποθέσεις ενισχύονται και από 2 μελέτες, τη μελέτη του van Duin M et al το 2002 και του Bleeker et. al το 2003, στις οποίες φάνηκε κατά σειρά ότι η μείωση του ιικού φορτίου αποτελεί καθοριστικό παράγοντα υποστρόφής της HPV αλλοίωσης, και ότι η συστηματική χρήση του προφυλακτικού για διάστημα 3 μηνών μπορεί να επιταχύνει την HPV κάθαρση, χωρίς να υπάρχει διαφοροποίηση έκβασης ακόμη και σε επέκταση της χρήσης του για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα . Μια πιθανή εξήγηση της παρατηρούμενης επίδρασης από τη χρήση του προφυλακτικού στο HPV status, μπορεί να αποτελέσει η υπόθεση ότι ο φυσικός φραγμός του προφυλακτικού εμποδίζει την ιική μετάδοση μεταξύ των σεξουαλικών συντρόφων, μειώνοντας το ιικό φορτίο και συνεπώς επιταχύνοντας με τον μηχανισμό αυτό την ιική κάθαρση και την υποστρόφή της HPV-σχετιζόμενης αλλοίωσης. Η επισήμανση αυτή αποκτά ιδιαίτερη κλινική σημασία καθώς το προτεινόμενο χρονικό διάστημα

της χρήσης προφυλακτικού εμφανίζει ικανοποιητικά ποσοστά συμμόρφωσης του πληθυσμού (343, 344).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η ενίσχυση και η παράταση της προστασίας από τη χρήση προφυλακτικού στην πρώτη μετεγχειρητική περίοδο θα μπορούσε να επιτευχθεί σε συνέργεια με τη χορήγηση του HPV εμβολίου υπό προϋποθέσεις και συνθήκες οι οποίες οδηγούν σε περεταίρω μείωση του εναπομείναντος ιικού φορτίου. Δεδομένου ότι οι υπάρχουσες μελέτες αποδίδουν τη μείωση του ιικού φορτίου (έως 80%) στην ίδια τη θεραπεία (ανεξαρτήτως χρησιμοποιούμενης μεθόδου και χειρουργικής πρακτικής), συστήνουν μετεγχειρητική αποφυγή των σεξουαλικών επαφών για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (έως και 1.5 μήνα), και με τα ευεργετικά αποτελέσματα της συστηματικής χρήσης προφυλακτικού στην εξέλιξη των HPV αλλοιώσεων στο γενικό πληθυσμό, σε συντομότερο χρονικό διάστημα από αυτό της παρούσας μελέτης, να έχουν ήδη αποδειχθεί (3 μήνες) σε προγενέστερες μελέτες, η υπόθεση της χρήσης προφυλακτικού την πρώτη μετεγχειρητική περίοδο με σύγχρονη εφαρμογή του HPV εμβολίου φαίνεται να αποκτά ρεαλιστική υπόσταση (311, 313, 343, 345, 350, 368).

Η λανθάνουσα HPV λοίμωξη δεν παύει παρόλα αυτά να αποτελεί μια πιθανότητα. Βασιζόμενοι στα δεδομένα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι δεν είναι ξεκάθαρο αν νέα επανα-λοίμωξη ή επανα-ενεργοποίηση μιας λανθάνουσας λοίμωξης είναι αυτή που ευθύνεται στην ανίχνευση του ιού σε γυναίκες που είχαν βρεθεί παλαιότερα θετικές στον ιό (370). Προς το παρόν υπάρχουν μόνο έμμεσες ενδείξεις σχετικά με την λανθάνουσα HPV λοίμωξη στο ανθρώπινο είδος. Παραδείγματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν η επανεμφάνιση του υποτύπου HPV 11 σχετιζόμενων θηλωμάτων στο λάρυγγα παιδιών, η ταχέως αναπτυσσόμενη εμφάνιση ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας σε HIV οροθετικές γυναίκες και τα γενετικά και δερματικά θηλώματα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού (371).

Παρά ταύτα η ύπαρξη λανθάνουσας λοίμωξης δεν έχει αποδειχθεί με άμεση παρατήρηση (π.χ. μέσω μικροτομής στην βασική μεμβράνη του επιθηλίου αποκαλύπτοντας ιικό πολλαπλασιασμό αλλά μη ενεργή λοίμωξη) και παρά το γεγονός ότι η αναζωπύρωση της λανθάνουσας λοίμωξης φαίνεται ως η πιθανότερη

των εξηγήσεων, δεν μπορεί να αποκλειστεί και η τεχνητή εισαγωγή μέσω της πρωκτικής βλέννης ή άλλων HPV φυσικών αποθηκών (reservoirs) του γενετικού συστήματος, που δεν έχουν μελετηθεί ακόμη (42).

Αδιευκρίνιστος παραμένει και ο ρόλος των προφυλακτικών HPV εμβολίων στη διεργασία της επανα-ενεργοποίησης της HPV λανθάνουσας λοίμωξης. Η «αποστειρωτική» ανοσία δεν μπορεί να θεωρηθεί αναμενόμενη από τα προφυλακτικά HPV εμβόλια τα οποία βασίζονται μεμονωμένα στις L1 πρωτεΐνες του καψιδίου του ιού. Αντιθέτως, τα αντισώματα εξουδετέρωσης που παράγονται από το εμβόλιο θα μπορούσαν να περιορίσουν την ενδοεπιθηλιακή επαναλοίμωξη, μέσω μείωσης της ιικής εξάπλωσης (40, 41, 63, 78, 235, 243, 245, 250, 372, 373).

Τρέχουσες μελέτες ερευνούν την αποτελεσματικότητα των HPV εμβολίων σε γυναίκες έως και την ηλικία των 45 ετών, όπως επίσης διεξάγονται μακροχρόνιες μελέτες σχετικά με τον εμβολιασμό γυναικών που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία για προκαρκινικές αλλοιώσεις (236, 240, 245, 374). Τα πρόδρομα αποτελέσματα των μελετών αυτών δείχνουν να υπάρχει απόλυτη κάθαρση της HPV λοίμωξης με τη χρήση τόσο του τετραδύναμου όσο και του διδύναμου εμβολίου για τις ηλικίες και άνω των 26 ετών (240, 374-379).

Τέλος, σε μια προσπάθεια ελαχιστοποίησης του χρονικού διαστήματος χρήσης προφυλακτικού, φαίνεται ότι η χρήση του στο πρώτο μετεγχειρητικό τρίμηνο έχει τα ίδια σημαντικά αποτελέσματα στην αρνητικοποίηση των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αυξήσει το ποσοστό συμμόρφωσης των γυναικών και των συντρόφων τους στη σύσταση για χρήση προφυλακτικού μετεγχειρητικά. Αναγκαία συνθήκη μιας τέτοιας πρακτικής αποτελεί ο αυστηρός περιορισμός των επαφών σε κολπικές, αποφεύγοντας εναλλακτικές διεισδύσεις, έτσι ώστε να αποκλειστεί η επαναλοίμωξη από φυσικές αποθήκες όπως ο πρωκτός και η στοματική κοιλότητα (380). Η σεξουαλική συμμόρφωση προς την κατεύθυνση αυτή και η αρνητικοποίηση του HPV DNA test μετεγχειρητικά, θα μπορούσε να οδηγήσει με ασφάλεια στη σύσταση του HPV εμβολιασμού όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Η παραπάνω πρόταση της μετεγχειρητικής παρακολούθησης γυναικών που έχουν θεραπευθεί για CIN, βασιζόμενη στον άξονα εκτίμησης των HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, της σύστασης συστηματικής χρήσης προφυλακτικού μετεγχειρητικά και

στη συνέχεια της εφαρμογής του HPV εμβολίου, θα μπορούσε να αποτελέσει παγκόσμια κατευθυντήρια οδηγία για όλες τις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για CIN, επάγοντας την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη κάθαρση από τον ιό καθώς και την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας θεραπευτικών αποτυχιών.

ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κύρια κλινικά συμπεράσματα της παρούσας μελέτης αφορούν:

1. Την επίδραση της συστηματικής χρήσης του προφυλακτικού μετά από θεραπεία για CIN και την μεταβολή των υπό μελέτη HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών, όπου όπως προκύπτει:
 - A. Αρνητικοποιεί στατιστικά σημαντικά το HPV DNA test.
 - B. Αντίστοιχα, στατιστικά σημαντική, είναι η αρνητικοποίηση και άλλων HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών όπως το mRNA E6 και E7 για τους 5 HR HPV τύπους (16, 18, 33, 31 και 45) με τη μεθοδολογία NASBA, το mRNA E6 και E7 για όλους τους HR HPV τύπους καθώς επίσης και το p16.
2. Την επίδραση της συστηματικής χρήσης του προφυλακτικού μετά από θεραπεία για CIN στη στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού των ανιχνευόμενων θεραπευτικών αποτυχιών, και συνεπώς είναι εύλογο να αναμένουμε και μείωση του ποσοστού των περιστατικών διηθητικού καρκίνου μετά από θεραπεία.
3. Τη συμμόρφωση των γυναικών στη συστηματική χρήση προφυλακτικού για την αρχική μετεγχειρητική περίοδο των 6 μηνών, η οποία όπως διαφαίνεται μειώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου από τη στιγμή της θεραπείας. Βασιζόμενοι στην παραδοχή ότι η χρήση προφυλακτικού στο γενικό πληθυσμό (χωρίς θεραπεία για CIN), εμφανίζει ευεργετικά αποτελέσματα όσον αφορά την κάθαρση και την υποστρόφη των αλλοιώσεων από τους 3 πρώτους μήνες, θα μπορούσαμε να αναμένουμε σημαντική μείωση της HPV θετικότητας και στις γυναίκες μετά από θεραπεία για CIN, αν αντί για 6 μήνες, που υπήρξε η σύσταση στη συγκεκριμένη μελέτη, προτεινόταν συστηματική χρήση του προφυλακτικού για χρονικό διάστημα 3 μηνών, με στόχο την αύξηση του ποσοστού συμμόρφωσης.
4. Τη μετεγχειρητική διαχείριση των γυναικών μετά από θεραπεία για CIN ακολουθώντας τον προτεινόμενο άξονα: θεραπεία για CIN – αυστηρή χρήση προφυλακτικού για χρονικό διάστημα 6 μηνών - HPV DNA test στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη και επί αρνητικού αποτελέσματος αυτού την εφαρμογή εμβολιασμού, με στόχο την απόλυτη προστασία αυτών των γυναικών έναντι σε νέες λοιμώξεις από τον ιό.

Συνεπώς η χρήση προφυλακτικού μετά από θεραπεία για CIN και HPV εμβόλιο, θα μπορούσε να αποτελέσει παγκόσμια κατευθυντήρια οδηγία για όλες τις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για CIN.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τίτλος: Η επίδραση της συστηματικής χρήσης προφυλακτικού κατά τη σεξουαλική επαφή, στη δραστηριότητα του ιού HPV, μετά από συντηρητική θεραπεία για CIN

Σκοπός: Μελέτη της συστηματικής επίδρασης της χρήσης προφυλακτικού στη δραστηριότητα του ιού HPV μετά από συντηρητική θεραπεία για CIN.

Υλικό και Μέθοδοι:

Σχεδιασμός: Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή.

Πληθυσμός: Γυναίκες στις οποίες αποφασίστηκε αφαιρετική μέθοδος θεραπείας (LLETZ) για CIN.

Μεθοδολογία: Αμέσως πριν την θεραπεία όλες οι γυναίκες τυχαιοποιήθηκαν σε δύο groups. Στο group A εκτός από τις μετεγχειρητικές πληροφορίες ρουτίνας δινόταν αυστηρή σύσταση για χρήση προφυλακτικού για το πρώτο μετεγχειρητικό εξάμηνο, ενώ στο group B δινόταν μόνο μετεγχειρητικές πληροφορίες ρουτίνας. Επιπλέον, πριν την επέμβαση σε όλες τις γυναίκες γινόταν δειγματοληψία τραχηλικού επιχρίσματος κυτταρολογίας υγρής φάσης (Thin Prep Pap Smear), το οποίο αποστέλλόταν για μοριακή ανάλυση HPV-δεικτών (ανίχνευση και τυποποίηση HPV DNA, HPV E6 & E7 mRNA με τη τεχνική NASBA και κυτταρομετρίας ροής καθώς και ανίχνευση έκφρασης της p16^{INK4a}). Στις μετεγχειρητικές επισκέψεις (6^{ος}, 12^{ος}, 18^{ος}, 24^{ος}, 36^{ος}, 48^{ος} και 60^{ος} μήνας) πραγματοποιούνταν επαναληπτική κολποσκόπηση και δειγματοληψία Thin Prep Pap Smear και οι γυναίκες συμπλήρωναν ερωτηματολόγιο σχετικό με την συμμόρφωσή τους στη χρήση προφυλακτικού.

Ανάλυση: Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την αρχική τυχαιοποίηση των γυναικών στα δύο groups. Υπολογίστηκαν ο relative risk (RR) και absolute RR (ARR) στην Intention To Treat analysis καθώς επίσης το number needed to treat (NNT) όπως επίσης και η συμμόρφωση των γυναικών στη σύστασή για χρήση προφυλακτικού. Έγινε επίσης υπολογισμός των παραμέτρων αξιοπιστίας στην ανίχνευση των θεραπευτικών αποτυχιών για κάθε HPV-σχετιζόμενο βιοδείκτη ξεχωριστά [Sensitivity (S), Specificity (Sp), Positive (PPV) and Negative Predictive Value (NPV)].

Αποτελέσματα: Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 204 γυναίκες, 98 στο group A και 104 στο group B. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της θετικότητας στην πλειονότητα των HPV-δεικτών στο group A ($p < 0.05$). Ειδικότερα, μόνο το 29.8% των γυναικών παρέμεινε θετικό στο HPV DNA test στο group A σε σύγκριση με το 69.2% στο group B στην 1^η μετεγχειρητική επίσκεψη [$p < 0.001$, RR=0.431, RRR=0.569, ARR=0.394, NNT=2]. Στατιστικά σημαντικά μειωμένη φάνηκε να είναι και η έκφραση των υπόλοιπων HPV-σχετιζόμενων βιοδεικτών όπως του mRNA E6 & E7 test καθώς επίσης και του p16^{INK4a}, στο Group A έξι μήνες μετά τη θεραπεία. Εννέα γυναίκες χρειάστηκε να υποβληθούν σε επαναληπτική θεραπεία με σημαντικό ποσοστό αυτών να προέρχεται από το control group ($p = 0.001$, RR=1.032, RRR=-0.032, ARR=-0.03, NNT=-34). Το HR HPV test εμφάνισε την καλύτερη Sensitivity: 90% στην ανίχνευση των CIN2+ θεραπευτικών αποτυχιών στους 24 μήνες από την επέμβαση, ενώ το test με την καλύτερη Specificity (Sp: 90%) ήταν το NASBA. Αξιοσημείωτο ήταν το χαμηλό ποσοστό συμμόρφωσης (59%) του πληθυσμού στη σύσταση για συστηματική χρήση προφυλακτικού (>75%).

Συμπεράσματα: Η χρήση προφυλακτικού μετά από θεραπεία για CIN φαίνεται να αυξάνει στατιστικά σημαντικά την αρνητικοποίηση του HPV και να μειώνει εξίσου σημαντικά τον κίνδυνο θεραπευτικής αποτυχίας. Η συμμόρφωση του πληθυσμού στη συστηματική χρήση προφυλακτικού την πρώιμη μετεγχειρητική περίοδο, είναι χαμηλή και μειώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου από τη στιγμή της θεραπείας. Βασιζόμενοι στην παραδοχή ότι η χρήση προφυλακτικού στο γενικό πληθυσμό (χωρίς θεραπεία για CIN), εμφανίζει ευεργετικά αποτελέσματα όσον αφορά την HPV κάθαρση και την υποστρόφη των αλλοιώσεων από τους 3 πρώτους μήνες, θα μπορούσαμε να αναμένουμε σημαντική μείωση της HPV θετικότητας και στις γυναίκες μετά από θεραπεία για CIN, και αυτή η προσαρμογή θα μπορούσε να αυξήσει τα ποσοστά συμμόρφωσης. Η μετεγχειρητική διαχείριση γυναικών μετά από θεραπεία για CIN ακολουθώντας τον προτεινόμενο άξονα: θεραπεία για CIN – αυστηρή χρήση προφυλακτικού για χρονικό διάστημα 6 μηνών - HPV DNA test στην πρώτη μετεγχειρητική επίσκεψη και επί αρνητικού αποτελέσματος αυτού την εφαρμογή εμβολιασμού, με στόχο την απόλυτη προστασία αυτών των γυναικών έναντι σε νέες λοιμώξεις από τον ιό, θα μπορούσε να αποτελέσει παγκόσμια κατευθυντήρια οδηγία για όλες τις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για CIN.

SUMMARY

Title: Effect of condom use after CIN treatment on HPV status: a randomised controlled trial

Introduction

The purpose of cervical cytology screening program is the early detection and treatment of pre-invasive lesions and, ultimately, the reduction in both the incidence and mortality from cervical cancer. Well-organised systematic call and recall screening programs with appropriate treatment of screen-detected intraepithelial lesions have resulted in a profound decrease in the incidence of invasive cervical cancer (by up to 80%) as pre-invasive lesions can be detected by the screening program and treated appropriately.

Approximately 10% of the total population screened in the UK will have an abnormal smear; a proportion of those will ultimately require treatment. The available conservative outpatient treatment methods, be they ablative or excisional, have high cure rates of over 90% for both. Despite the high success rates, some women (5-10%) will require repeat treatment for residual or recurrent disease. Women post-treatment also remain at 4-5 times greater risk of future invasive disease in comparison to the general population. A technique that would achieve optimal disease eradication does not exist.

The role of condom use in the prevention of HPV infections and intra-epithelial disease has been investigated in the past. Data suggest that consistent condom use may reduce HPV infection and, as a result, intra-epithelial disease rates in HPV-naïve women; may also favours lower progression rates to high-grade (CIN2-3) or invasive lesions and can protect against anogenital warts. Evidence on the role of condom use after CIN treatment is poor.

Aim

This study aims to assess the effect of condom use versus routine post-operative surveillance on HPV DNA status, other HPV-related biomarkers and ultimately on treatment failure rates

Material & Methods

Design: Single-blinded randomised controlled trial (RCT)

Setting: This study has taken place at the Colposcopy Clinic of the University Hospital of Ioannina from May 2008 till Nov 2013.

Population-Inclusion and Exclusion criteria: Eligible individuals were women of all ages referred to the colposcopy clinic with any degree of abnormality in their Pap smear and for whom a decision for conservative treatment was made. We excluded women who were found to have cervical cancer after treatment, those who decided to undergo hysterectomy, women who had excisional treatment in the past and these women for whom a Liquid Based Cytology (LBC) sample was not available prior to the treatment.

Intervention: Women randomly allocated to Group A were given strong recommendation for consistent condom use, whilst women in Group B received routine post-treatment information and advice.

An LBC sample was tested for HPV typing, E6 & E7 mRNA (NASBA technique), E6 & E7 mRNA by flow cytometry and p16^{INK4a} at 0 (pre-treatment), 6, 12, 18 and 24 months post-treatment. A validated questionnaire to assess compliance was also completed at each follow-up visit. Women were followed up every 6 months for 2 years and annually thereafter. Decision for investigation (biopsy) and treatment relied on cytology and colposcopy as per local protocols.

Outcomes: The HR-HPV status at 6 months post-operatively was the primary outcome of our study. Secondary outcomes were HR-HPV status at 12, 18, 24, 36, 48 and 60 months, the overall HPV and other HPV-related biomarkers status (NASBA technique, flow cytometry, p16^{INK4a}) at 6, 12, 18, 24, 36, 48 and 60 months as well as the p value, Absolute Relative Risk (ARR), Relative Risk (RR), Relative Risk Reduction (RRR) and Number Needed to Treat (NNT) for the treatment failure rates at 24 months. Accuracy parameters: Sensitivity (S), Specificity (Sp), Positive and Negative Predictive Value were calculated for the detection of CIN2+ at treatment failure cases were also calculated for all HPV DNA and all the HPV-related biomarkers. Compliance rates to the consistent condom use advice post-operatively were also assessed.

Results

A total of 226 women were recruited and 204 of them included to the final analysis. Ninety eight women were allocated to the intervention group (Group A) and 106 in Group B (controls). The median age in Group A was 39 years and 37 in Group B. Smokers were 58% of the women in Group B and 47% of women in Group B. Seventy five percent of the women in Group A had started sexual intercourses at younger age of 18 and 57% of them had more than 3 lifetime sex partners, while in Group B the percentages were 73.6% and 56.6% respectively. Most of the treatments in both Groups (60%) were performed for high grade disease (CIN2+). The positivity for all tested HPV-related biomarkers at follow-up was significantly reduced in Group A. In particular, in the analysis of all initially positive HPV women, at the sixth month visit only 31.6% (30/98) of women tested positive for HPV in Group A in comparison to 63.1% (65/106) of women in Group B ($P < 0.0001$, Chi-squared=7.368, RR= 0.051 [95% CI: 0.003 to 0.846], RRR=0.949 [95% CI: 0.154 to 0.997], ARR=0.11 [95% CI: 0.041 to 0.19], NNT=9 [95% CI: 24 to 5]). Significant was found and the reduction in mRNA E6 & E7 positivity rates for the HR HPV types 16,18,31,33 and 45 by NASBA test ($p=0.007$, Chi-squared=0.295, RR= 0.5 [95% CI: 0.359 to 0.697], RRR=0.219, [95% CI: -0.509 to 0.596], ARR=0.037 [95% CI: -0.064 to 0.136], NNT=26 [95% CI: -16 to 7]). Similarly condom use appeared to reduce statistical significantly and the positivity rates for p16. ($p=0.001$, Chi-squared=0.295, RR= 0.118 [95% CI: 0.028 to 0.49], RRR=0.882 [95% CI: 0.51 to 0.972], ARR=0.166 [95% CI: 0.083 to 0.253], NNT= 6 [95% CI: 12 to 4]). Univariate and Multivariate analysis were performed in order to assess factors that may affect post-treatment HPV-related biomarker's status. The particular analysis produced the following statistically significant results: a. Higher risk of positive mRNA E6 & E7 detected by flow cytometry at the 6 month follow up visit for subjects less than 35 years old, those who have not had a vaginal delivery, those with histology CIN2+, and those with crypt involvement. B. Lower risk of a positive HPV DNA test, NASBA and p16 in those that use condoms consistently. There were 9 treatment failure cases, with significantly higher proportion in control arm ($p=0.001$, RR=1.032 [95% CI: 0.564 to 1.887], RRR=-0.032 [95% CI: -0.887 to 0.436], ARR=-0.03 [95% CI: -0.788 to 0.748], NNT=-34 [95% CI: -1 to 1]). HR HPV test achieved the best Sensitivity: 90% while the test with the best Specificity: 90% was

the NASBA in prediction of CIN2+ treatment failures at 24m visit. Only 56% (55/98) of women received recommendation, used condoms consistently (>75%) in the first post-operative period and this rate appeared to be decreasing by the time in the next follow up visits.

Conclusions

Post-treatment condom use reduces significantly HPV DNA positivity as well as the positivity of HPV-related biomarkers post-operatively. Significant is also and the reduction on treatment failure rates of either: a. residual disease, b. recurrent disease, and c. possibly the long term invasive cervical cancer. Compliance to consistent condom use after treatment is an issue. However, evidence suggests that condoms effect on HPV status can be clearly drawn even after 3 months usage; so this adjustment could increase compliance rates. To secure and prolong the protective effect of condoms on HPV status in a realistic basis, vaccination for HPV could be suggested at the time of 1st post-operative visit, since women have been used condoms in sexual intercourses and tested negative on the HPV test. Such a post-treatment policy seems to be feasible in everyday colposcopy practice and could be applied as a worldwide guideline.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F12-23.
2. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013 Dec 31;31 Suppl 7:H1-31.
3. Arbyn M, Primic-Zakelj M, Raifu AO, Grce M, Paraskevaidis E, Diakomanolis E, et al. The burden of cervical cancer in south-east Europe at the beginning of the 21st century. *Coll Antropol*. 2007 Apr;31 Suppl 2:7-10.
4. Arbyn M, Raifu AO, Autier P, Ferlay J. Burden of cervical cancer in Europe: estimates for 2004. *Ann Oncol*. 2007 Oct;18(10):1708-15.
5. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol*. 2005 Mar;16(3):481-8.
6. International Union against Cancer., International Agency for Research on Cancer., International Association of Cancer Registries. *Cancer incidence in five continents*. Berlin ; New York: Distributed for the Union by Springer-Verlag; 1966. p. v.
7. Parkin DM, International Agency for Research on Cancer., International Association of Cancer Registries. *Cancer incidence in five continents. Volumes I to VIII*. Lyon, France: IARCPress; 2005.
8. Sant M, Aareleid T, Berrino F, Bielska Lasota M, Carli PM, Faivre J, et al. EURO CARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. *Ann Oncol*. 2003;14 Suppl 5:v61-118.
9. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer research*. 1976 Feb;36(2 pt 2):794.
10. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1977;78:1-30.
11. Cervical Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008 S. GLOBOCAN (IARC). section of cancer information. 2008 7/7/2011.
12. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27.
13. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jan 13;88(1):63-73.
14. Griffin NR, Bevan IS, Lewis FA, Wells M, Young LS. Demonstration of multiple HPV types in normal cervix and in cervical squamous cell carcinoma using the polymerase chain reaction on paraffin wax embedded material. *J Clin Pathol*. 1990 Jan;43(1):52-6.
15. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Jul;7(7):453-9.
16. Laukkanen P, Koskela P, Pukkala E, Dillner J, Laara E, Knekt P, et al. Time trends in incidence and prevalence of human papillomavirus type 6, 11 and 16 infections in Finland. *J Gen Virol*. 2003 Aug;84(Pt 8):2105-9.
17. Peto J, Gilham C, Deacon J, Taylor C, Evans C, Binns W, et al. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. *Br J Cancer*. 2004 Aug 31;91(5):942-53.
18. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer*. 2006 Dec 1;119(11):2677-84.

19. Castle PE, Jeronimo J, Schiffman M, Herrero R, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Res.* 2006 Jan 15;66(2):1218-24.
20. Munoz N, Mendez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis.* 2004 Dec 15;190(12):2077-87.
21. Wellings K, Collumbien M, Slaymaker E, Singh S, Hodges Z, Patel D, et al. Sexual behaviour in context: a global perspective. *Lancet.* 2006 Nov 11;368(9548):1706-28.
22. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K1-16.
23. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005 Jun 1;191(11):1808-16.
24. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):690-8.
25. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004 Jun 20;324(1):17-27.
26. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA.* 2007 Feb 28;297(8):813-9.
27. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70.
28. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003 Jul 7;89(1):101-5.
29. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Mar 1;98(5):303-15.
30. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010 Dec 15;202(12):1789-99.
31. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1072-9.
32. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Apr;55(4):244-65.
33. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342-50.
34. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9.
35. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002 Nov;89(2):191-9.
36. Smith EM, Ritchie JM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Turek LP, et al. Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2007 Feb 15;120(4):825-32.

37. Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, et al. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F24-33.
38. Paavonen J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. *Int J Infect Dis*. 2007 Nov;11 Suppl 2:S3-9.
39. Huh WK. Human papillomavirus infection: a concise review of natural history. *Obstet Gynecol*. 2009 Jul;114(1):139-43.
40. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S16-22.
41. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007 Sep 8;370(9590):890-907.
42. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003(31):14-9.
43. Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol*. 1985 Jul;66 (Pt 7):1515-22.
44. Cotton SC, Sharp L, Seth R, Masson LF, Little J, Cruickshank ME, et al. Lifestyle and socio-demographic factors associated with high-risk HPV infection in UK women. *Br J Cancer*. 2007 Jul 2;97(1):133-9.
45. Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders PJ, Meijer CJ, Thomas JO, et al. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Nov;15(11):2148-53.
46. Διακομανώλης Ε. Κολποσκόπηση & Παθολογία του Κατώτερου Γεννητικού Συστήματος της Γυναίκας. 1η ed. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης ΕΠΕ; 2010.
47. Szarewski A, Jarvis MJ, Sasieni P, Anderson M, Edwards R, Steele SJ, et al. Effect of smoking cessation on cervical lesion size. *Lancet*. 1996 Apr 6;347(9006):941-3.
48. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*. 2001 Jun 20;285(23):2995-3002.
49. Castle PE, Wacholder S, Sherman ME, Lorincz AT, Glass AG, Scott DR, et al. Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer*. 2002 Nov 15;95(10):2145-51.
50. Kjaer S, Hogdall E, Frederiksen K, Munk C, van den Brule A, Svare E, et al. The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res*. 2006 Nov 1;66(21):10630-6.
51. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis*. 2007 Jun 1;195(11):1582-9.
52. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*. 2005 Jun 20;337(1):76-84.
53. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jul 20;97(14):1066-71.
54. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis*. 2009;9:119.

55. Westergaard L, Norgaard M. Severe cervical dysplasia. Control by biopsies or primary conization? A comparative study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1981;60(6):549-54.
56. Kataja V, Syrjanen K, Mantyjärvi R, Vayrynen M, Syrjanen S, Saarikoski S, et al. Prospective follow-up of cervical HPV infections: life table analysis of histopathological, cytological and colposcopic data. *Eur J Epidemiol.* 1989 Mar;5(1):1-7.
57. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993 Apr;12(2):186-92.
58. Cox JT, Schiffman M, Solomon D. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Jun;188(6):1406-12.
59. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH, Liaw KL, Barr E. Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women. *Infect Agent Cancer.* 2007;2:15.
60. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis.* 2005 Mar 1;191(5):731-8.
61. Aoyama C, Peters J, Senadheera S, Liu P, Shimada H. Uterine cervical dysplasia and cancer: identification of c-myc status by quantitative polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol.* 1998 Dec;7(6):324-30.
62. Shroyer KR, Lovelace GS, Abarca ML, Fennell RH, Corkill ME, Woodard WD, et al. Detection of human papillomavirus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in human papillomavirus equivocal and dysplastic cervical biopsies. *Hum Pathol.* 1993 Sep;24(9):1012-6.
63. Goldie SJ, Kohli M, Grima D, Weinstein MC, Wright TC, Bosch FX, et al. Projected clinical benefits and cost-effectiveness of a human papillomavirus 16/18 vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Apr 21;96(8):604-15.
64. Sanders GD, Taira AV. Cost-effectiveness of a potential vaccine for human papillomavirus. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jan;9(1):37-48.
65. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C, Weiss NS, Kuypers JM, et al. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA.* 2002 Oct 9;288(14):1749-57.
66. Sinanovic E, Moodley J, Barone MA, Mall S, Cleary S, Harries J. The potential cost-effectiveness of adding a human papillomavirus vaccine to the cervical cancer screening programme in South Africa. *Vaccine.* 2009 Oct 19;27(44):6196-202.
67. Kulasingam SL, Myers ER. Potential health and economic impact of adding a human papillomavirus vaccine to screening programs. *JAMA.* 2003 Aug 13;290(6):781-9.
68. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2001 Jun 9;357(9271):1831-6.
69. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003 Feb 1;157(3):218-26.
70. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Jun;12(6):485-90.
71. Rodriguez AC, Burk R, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, et al. The natural history of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial

- neoplasia among young women in the Guanacaste cohort shortly after initiation of sexual life. *Sex Transm Dis*. 2007 Jul;34(7):494-502.
72. Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006 Mar 15;118(6):1481-95.
 73. Cancer ICoESoC. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006 Sep 1;119(5):1108-24.
 74. Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet*. 2003 Apr 5;361(9364):1159-67.
 75. Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer*. 2004 Sep 1;111(3):431-9.
 76. Garcia-Closas R, Castellsague X, Bosch X, Gonzalez CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer*. 2005 Nov 20;117(4):629-37.
 77. Khan MJ, Partridge EE, Wang SS, Schiffman M. Socioeconomic status and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer*. 2005 Jul 1;104(1):61-70.
 78. Palefsky JM, Gillison ML, Strickler HD. Chapter 16: HPV vaccines in immunocompromised women and men. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/140-6.
 79. Andrei G, Snoeck R, Piette J, Delvenne P, De Clercq E. Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines. *Oncol Res*. 1998;10(10):523-31.
 80. Combita AL, Touze A, Bousarghin L, Sizaret PY, Munoz N, Coursaget P. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett*. 2001 Oct 16;204(1):183-8.
 81. Gilbert DM, Cohen SN. Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell*. 1987 Jul 3;50(1):59-68.
 82. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*. 2001 Feb;75(3):1565-70.
 83. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem*. 1999 Feb 26;274(9):5810-22.
 84. Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res*. 2002 Nov;89(2):249-61.
 85. Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 1992 Sep 18;70(6):923-35.
 86. Vousden K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB J*. 1993 Jul;7(10):872-9.
 87. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989 Feb 17;243(4893):934-7.

88. Zhou X, Han S, Wang S, Chen X, Dong J, Shi X, et al. Polymorphisms in HPV E6/E7 protein interacted genes and risk of cervical cancer in Chinese women: a case-control analysis. *Gynecol Oncol.* 2009 Aug;114(2):327-31.
89. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999 Dec 15;59(24):6132-6.
90. Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol.* 2004 Jan;202(1):23-33.
91. Pett MR, Alazawi WO, Roberts I, Downen S, Smith DI, Stanley MA, et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1359-68.
92. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3878-84.
93. Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, et al. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene.* 2003 Oct 16;22(46):7233-42.
94. Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 2001 Mar;10(1):46-54.
95. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol.* 1991 Feb;65(2):606-12.
96. von Knebel Doeberitz M, Bauknecht T, Bartsch D, zur Hausen H. Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Feb 15;88(4):1411-5.
97. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 28;92(5):1654-8.
98. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* 1995 May;69(5):2989-97.
99. Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene.* 2006 Sep 28;25(44):5985-93.
100. Reuter S, Bartelmann M, Vogt M, Geisen C, Napierski I, Kahn T, et al. APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *EMBO J.* 1998 Jan 2;17(1):215-22.
101. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res.* 2008 Jan 1;68(1):307-13.
102. Kessis TD, Connolly DC, Hedrick L, Cho KR. Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene.* 1996 Jul 18;13(2):427-31.
103. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in

- intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res.* 2004 May 1;10(9):3059-63.
104. Martin A, Baran-Marzak F, El Mansouri S, Legendre C, Leblond V, Charlotte F, et al. Expression of p16/INK4a in posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol.* 2000 May;156(5):1573-9.
 105. Reuschenbach M, Waterboer T, Wallin KL, Eienkel J, Dillner J, Hamsikova E, et al. Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers. *Int J Cancer.* 2008 Dec 1;123(11):2626-31.
 106. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, Mazo A, Leonart ME, Castellvi J, et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 2011 May 5;30(18):2087-97.
 107. Lam AK, Ong K, Giv MJ, Ho YH. p16 expression in colorectal adenocarcinoma: marker of aggressiveness and morphological types. *Pathology.* 2008 Oct;40(6):580-5.
 108. 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 Apr 15;92(2):276-84.
 109. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol.* 2003 Feb;27(2):187-93.
 110. Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS, et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Mar;190(3):668-73.
 111. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002 Nov;26(11):1389-99.
 112. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6031-43.
 113. Saavedra KP, Brebi PM, Roa JC. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clin Epigenetics.* 2012;4(1):13.
 114. Whiteside MA, Siegel EM, Unger ER. Human papillomavirus and molecular considerations for cancer risk. *Cancer.* 2008 Nov 15;113(10 Suppl):2981-94.
 115. Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer.* 2007;6:60.
 116. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood.* 2006 Dec 1;108(12):3646-53.
 117. Bock C. Epigenetic biomarker development. *Epigenomics.* 2009 Oct;1(1):99-110.
 118. Rouhi A, Mager DL, Humphries RK, Kuchenbauer F. MiRNAs, epigenetics, and cancer. *Mamm Genome.* 2008 Aug;19(7-8):517-25.
 119. Leonard SM, Wei W, Collins SI, Pereira M, Diyaf A, Constandinou-Williams C, et al. Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis.* 2012 Jul;33(7):1286-93.
 120. Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingoes B, Kleebkaow P, et al. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer.* 2013 May 1;132(9):2087-94.
 121. Das P, Thomas A, Mahantshetty U, Shrivastava SK, Deodhar K, Mulherkar R. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women. *PLoS One.* 2012;7(7):e41012.

122. Wilting SM, van Boerdonk RA, Henken FE, Meijer CJ, Diosdado B, Meijer GA, et al. Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:167.
123. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J*. 2011 May;278(10):1598-609.
124. Zheng ZM, Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov-Dec;1809(11-12):668-77.
125. Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, Fuks F. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene*. 2007 Mar 8;26(11):1650-5.
126. McCabe MT, Davis JN, Day ML. Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer Res*. 2005 May 1;65(9):3624-32.
127. Jimenez-Wences H, Peralta-Zaragoza O, Fernandez-Tilapa G. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol Rep*. 2014 Jun;31(6):2467-76.
128. Jin-Tao W, Ling D, Shi-Wen J, Junxia H, Wei-Min Z, Qin Z, et al. Folate Deficiency and Aberrant Expression of DNA Methyltransferase 1 were Associated with Cervical Cancerization. *Curr Pharm Des*. 2013;20(11):1639-46.
129. Jeong HM, Kwon MJ, Shin YK. Overexpression of Cancer-Associated Genes via Epigenetic Derepression Mechanisms in Gynecologic Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:12.
130. Spencer J. *Cervical Cancer*. New York: Chelsea House an Imprint of Infobase Publishing; 2007.
131. Reagan JW, Seidemann IL, Saracusa Y. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *Cancer*. 1953 Mar;6(2):224-34.
132. Richart RM, Barron BA. The intrauterine device and cervical neoplasia. A prospective study of patients with cervical dysplasia. *JAMA*. 1967 Mar 13;199(11):817-9.
133. Richart RM, Lerch V, Barron BA. A time-lapse cinematographic study in vitro of mitosis in normal human cervical epithelium, dysplasia, and carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst*. 1967 Sep;39(3):571-7.
134. Wilbanks GD, Richart RM. The puerperal cervix, injuries and healing. A colposcopic study. *Am J Obstet Gynecol*. 1967 Apr 15;97(8):1105-10.
135. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002 Apr 24;287(16):2114-9.
136. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki AB, Smith RA, Eyre HJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin*. 2002 Nov-Dec;52(6):342-62.
137. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA*. 2002 Apr 24;287(16):2120-9.
138. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2000 May 16;132(10):810-9.
139. Jafari K. False-negative Pap smear in uterine malignancy. *Gynecol Oncol*. 1978 Feb;6(1):76-82.
140. Xiao GQ, Emanuel PO. Cervical parakeratosis/hyperkeratosis as an important cause for false negative results of Pap smear and human papillomavirus test. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2009 Jun;49(3):302-6.
141. Stoler MH. HPV for cervical cancer screening: is the era of the molecular pap smear upon us? *J Histochem Cytochem*. 2001 Sep;49(9):1197-8.

142. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA*. 2001 Mar 21;285(11):1500-5.
143. Hartmann KE, Hall SA, Nanda K, Boggess JF, Zolnoun D. Screening for Cervical Cancer. *Systematic Evidence Reviews*. 2002 Jan;No. 25.
144. Hutchinson ML, Zahniser DJ, Sherman ME, Herrero R, Alfaro M, Bratti MC, et al. Utility of liquid-based cytology for cervical carcinoma screening: results of a population-based study conducted in a region of Costa Rica with a high incidence of cervical carcinoma. *Cancer*. 1999 Apr 25;87(2):48-55.
145. Bishop JW, Cheuvront DA, Elston RJ. Utility of residual AutoCyte cervical cytology samples for image analysis. *Acta Cytol*. 1999 Jan-Feb;43(1):39-46.
146. Davey DD. Cervical cancer screening: will human papillomavirus testing replace cytology? *J Low Genit Tract Dis*. 2004 Jan;8(1):6-9.
147. Lorincz AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Aug;127(8):959-68.
148. Luft F, Klaes R, Nees M, Durst M, Heilmann V, Melsheimer P, et al. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer*. 2001 Apr 1;92(1):9-17.
149. Koliopoulos G, Valasoulis G, Zilakou E. An update review on HPV testing methods for cervical neoplasia. *Expert Opin Med Diagn*. 2009;3(2):123-31.
150. Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R. Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-Nanogold, and silver acetate autometallography: detection of single-copy human papillomavirus. *Am J Pathol*. 1997 May;150(5):1553-61.
151. Melchers W, van den Brule A, Walboomers J, de Bruin M, Burger M, Herbrink P, et al. Increased detection rate of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction as compared to modified FISH and southern-blot analysis. *J Med Virol*. 1989 Apr;27(4):329-35.
152. Poljak M, Marin IJ, Seme K, Vince A. Hybrid Capture II HPV Test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J Clin Virol*. 2002 Dec;25 Suppl 3:S89-97.
153. Lorincz AT. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res*. 1996 Dec;22(6):629-36.
154. Castle PE, Schiffman M, Burk RD, Wacholder S, Hildesheim A, Herrero R, et al. Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Nov;11(11):1394-9.
155. Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH, Manos MM, Lorincz AT, Burk RD, et al. Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. *J Clin Microbiol*. 1997 Sep;35(9):2262-5.
156. Smits HL, Bollen LJ, Tjong AHSP, Vonk J, Van Der Velden J, Ten Kate FJ, et al. Intermethod variation in detection of human papillomavirus DNA in cervical smears. *J Clin Microbiol*. 1995 Oct;33(10):2631-6.
157. Castle PE, Wheeler CM, Solomon D, Schiffman M, Peyton CL. Interlaboratory reliability of Hybrid Capture 2. *Am J Clin Pathol*. 2004 Aug;122(2):238-45.
158. Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol*. 2007 Jan;104(1):232-46.
159. Castle PE, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, et al. Comparison between prototype hybrid capture 3 and hybrid capture 2 human papillomavirus DNA

- assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep;41(9):4022-30.
160. Narimatsu R, Patterson BK. High-throughput cervical cancer screening using intracellular human papillomavirus E6 and E7 mRNA quantification by flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2005 May;123(5):716-23.
 161. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan;38(1):357-61.
 162. Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.* 1998 Dec;153(6):1731-9.
 163. Park TC, Kim CJ, Koh YM, Lee KH, Yoon JH, Kim JH, et al. Human papillomavirus genotyping by the DNA chip in the cervical neoplasia. *DNA Cell Biol.* 2004 Feb;23(2):119-25.
 164. Takacs T, Jeney C, Kovacs L, Mozes J, Benczik M, Sebe A. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J Virol Methods.* 2008 Apr;149(1):153-62.
 165. Kocjan BJ, Seme K, Poljak M. Detection and differentiation of human papillomavirus genotypes HPV-6 and HPV-11 by FRET-based real-time PCR. *J Virol Methods.* 2008 Nov;153(2):245-9.
 166. Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedal H, Karlsen F, Hagmar B. Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *Br J Cancer.* 2004 Apr 5;90(7):1407-13.
 167. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495-503.
 168. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 1991 Mar 7;350(6313):91-2.
 169. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996 Mar;14(3):303-8.
 170. Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol.* 1998 Jan;16(1):49-53.
 171. Leone G, van Schijndel H, van Gemen B, Kramer FR, Schoen CD. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Res.* 1998 May 1;26(9):2150-5.
 172. Arens M. Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV, and HIV. *J Clin Virol.* 2001 Aug;22(1):11-29.
 173. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32 Suppl 1:S43-51.
 174. Melchers WJ, Bakkers JM, Wang J, de Wilde PC, Boonstra H, Quint WG, et al. Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad spectrum of human papillomavirus types. Clinical evaluation and follow-up. *Am J Pathol.* 1999 Nov;155(5):1473-8.
 175. Halfon P, Trepo E, Antoniotti G, Bernot C, Cart-Lamy P, Khiri H, et al. Prospective evaluation of the Hybrid Capture 2 and AMPLICOR human papillomavirus (HPV) tests for detection of 13 high-risk HPV genotypes in atypical squamous cells of uncertain significance. *J Clin Microbiol.* 2007 Feb;45(2):313-6.
 176. Poljak M, Fujs K, Seme K, Kocjan BJ, Vrtacnik-Bokal E. Retrospective and prospective evaluation of the Amplicor HPV test for detection of 13 high-risk human papillomavirus genotypes on 862 clinical samples. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2005 Dec;14(4):147-52.

177. Sandri MT, Lentati P, Benini E, Dell'Orto P, Zorzino L, Carozzi FM, et al. Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):2141-6.
178. Gomez-Roman JJ, Echevarria C, Salas S, Gonzalez-Moran MA, Perez-Mies B, Garcia-Higuera I, et al. A type-specific study of human papillomavirus prevalence in cervicovaginal samples in three different Spanish regions. *APMIS.* 2009 Jan;117(1):22-7.
179. Pista A, Verdasca N, Oliveira A. Clinical performance of the CLART human papillomavirus 2 assay compared with the hybrid capture 2 test. *J Med Virol.* 2011 Feb;83(2):272-6.
180. Sias C, Garbuglia AR, Piselli P, Cimaglia C, Lapa D, Del Nonno F, et al. Comparison of the Abbott RealTime High Risk HPV with Genomica HPV Clinical Array for the detection of human papillomavirus DNA. *APMIS.* 2013 Nov;121(11):1054-63.
181. Nazeer S, Shafi MI. Objective perspective in colposcopy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Oct;25(5):631-40.
182. Apgar B, Brotzman G, Spitzer M. *Colposcopy: Principles and Practice.* 2nd, ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.
183. Shafi M, Saloney N. *Colposcopy: A Practical Guide.* 2nd ed. Cambridge: University Press; 2012.
184. Walker P, Dexeus S, De Palo G, Barrasso R, Campion M, Girardi F, et al. International terminology of colposcopy: an updated report from the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol.* 2003 Jan;101(1):175-7.
185. Bodo M, Toth V. [New classification in cervical cytology: the Bethesda system]. *Orv Hetil.* 1991 May 12;132(19):1039-40.
186. Kurman RJ, Malkasian GD, Jr., Sedlis A, Solomon D. From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new cervical cytologic classification. *Obstet Gynecol.* 1991 May;77(5):779-82.
187. Oren A, Fernandes J. The Bethesda system for the reporting of cervical/vaginal cytology. *J Am Osteopath Assoc.* 1991 May;91(5):476-9.
188. Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis: an overview. *Int J Gynecol Pathol.* 1991;10(4):323-5.
189. Sherman ME, Solomon D, Schiffman M. Qualification of ASCUS. A comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL Triage Study. *Am J Clin Pathol.* 2001 Sep;116(3):386-94.
190. Robertson JH, Woodend B. Management of cervical dyskaryosis. Accurate diagnosis is essential. *BMJ.* 1994 Jul 23;309(6949):268-9.
191. Robertson JH, Woodend B, Elliott H. Cytological changes preceding cervical cancer. *J Clin Pathol.* 1994 Mar;47(3):278-9.
192. Stoler MH, Wright TC, Jr., Cuzick J, Dockter J, Reid JL, Getman D, et al. APTIMA HPV assay performance in women with atypical squamous cells of undetermined significance cytology results. *Am J Obstet Gynecol.* 2013 Feb;208(2):144 e1-8.
193. Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med.* 2003 Aug;127(8):946-9.
194. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine.* 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/78-89.
195. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 1998 Oct;92(4 Pt 2):727-35.

196. Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer*. 2001 Jun 15;84(12):1616-23.
197. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Sep 18;94(18):1406-14.
198. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Mar 1;92(5):397-402.
199. Insinga RP, Glass AG, Rush BB. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jul;191(1):105-13.
200. Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, Colgan TJ, Styer PE, Mody DR. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Pathol Lab Med*. 2004 Nov;128(11):1224-9.
201. Jones BA, Novis DA. Cervical biopsy-cytology correlation. A College of American Pathologists Q-Probes study of 22 439 correlations in 348 laboratories. *Arch Pathol Lab Med*. 1996 Jun;120(6):523-31.
202. Massad LS, Collins YC, Meyer PM. Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda system. *Gynecol Oncol*. 2001 Sep;82(3):516-22.
203. Discacciati MG, de Souza CA, d'Otavianno MG, Angelo-Andrade LA, Westin MC, Rabelo-Santos SH, et al. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011 Apr;155(2):204-8.
204. Ho GY, Einstein MH, Romney SL, Kadish AS, Abadi M, Mikhail M, et al. Risk factors for persistent cervical intraepithelial neoplasia grades 1 and 2: managed by watchful waiting. *J Low Genit Tract Dis*. 2011 Oct;15(4):268-75.
205. Anttila A, von Karsa L, Aasmaa A, Fender M, Patnick J, Rebolj M, et al. Cervical cancer screening policies and coverage in Europe. *Eur J Cancer*. 2009 Oct;45(15):2649-58.
206. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition--summary document. *Ann Oncol*. 2010 Mar;21(3):448-58.
207. Arbyn M, Herbert A, Schenck U, Nieminen P, Jordan J, McGoogan E, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for collecting samples for conventional and liquid-based cytology. *Cytopathology*. 2007 Jun;18(3):133-9.
208. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2007;90:1-636.
209. Davey E, d'Assuncao J, Irwig L, Macaskill P, Chan SF, Richards A, et al. Accuracy of reading liquid based cytology slides using the ThinPrep Imager compared with conventional cytology: prospective study. *BMJ*. 2007 Jul 7;335(7609):31.
210. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K29-41.
211. Meissner HI, Tiro JA, Yabroff KR, Haggstrom DA, Coughlin SS. Too much of a good thing? Physician practices and patient willingness for less frequent pap test screening intervals. *Med Care*. 2010 Mar;48(3):249-59.
212. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskeva E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive

- cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2006 Feb 11;367(9509):489-98.
213. Naucler P, Ryd W, Tornberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med*. 2007 Oct 18;357(16):1589-97.
 214. Bulkmand NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet*. 2007 Nov 24;370(9601):1764-72.
 215. Syrjanen K, Di Bonito L, Goncalves L, Murjal L, Santamaria M, Mahovic V, et al. Cervical cancer screening in Mediterranean countries: implications for the future. *Cytopathology*. 2010 Dec;21(6):359-67.
 216. Monsonego J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjanen K, Smith JS. Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (the FASE study). *Gynecol Oncol*. 2012 Apr;125(1):175-80.
 217. Nieves L, Enerson CL, Belinson S, Brainard J, Chiesa-Vottero A, Nagore N, et al. Primary cervical cancer screening and triage using an mRNA human papillomavirus assay and visual inspection. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Mar;23(3):513-8.
 218. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Wolf H, Dorries K, Egger H. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. *Int J Cancer*. 1974 May 15;13(5):657-64.
 219. Quinn M, Babb P, Jones J, Allen E. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics. *BMJ*. 1999 Apr 3;318(7188):904-8.
 220. Burger EA, Kornor H, Klemp M, Lauvrak V, Kristiansen IS. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol*. 2011 Mar;120(3):430-8.
 221. Tsoumpou I, Valasoulis G, Founta C, Kyrgiou M, Nasioutziki M, Daponte A, et al. High-risk human papillomavirus DNA test and p16(INK4a) in the triage of LSIL: a prospective diagnostic study. *Gynecol Oncol*. 2011 Apr;121(1):49-53.
 222. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med*. 2009 Apr 2;360(14):1385-94.
 223. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*. 2007 Oct 18;357(16):1579-88.
 224. Miller RA. Medical diagnostic decision support systems--past, present, and future: a threaded bibliography and brief commentary. *J Am Med Inform Assoc*. 1994 Jan-Feb;1(1):8-27.
 225. Kawamoto K, Houlihan CA, Balas EA, Lobach DF. Improving clinical practice using clinical decision support systems: a systematic review of trials to identify features critical to success. *BMJ*. 2005 Apr 2;330(7494):765.
 226. Lisboa PJ, Taktak AF. The use of artificial neural networks in decision support in cancer: a systematic review. *Neural Netw*. 2006 May;19(4):408-15.
 227. Karakitsos P, Chrelas C, Pouliakis A, Koliopoulos G, Spathis A, Kyrgiou M, et al. Identification of women for referral to colposcopy by neural networks: a preliminary study based on LBC and molecular biomarkers. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:303192.

228. Karakitsos P, Pouliakis A, Meristoudis C, Margari N, Kassanos D, Kyrgiou M, et al. A preliminary study of the potential of tree classifiers in triage of high-grade squamous intraepithelial lesions. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. 2011;33(3):132-40.
229. Bountris P, Haritou M, Pouliakis A, Margari N, Kyrgiou M, Spathis A, et al. An intelligent clinical decision support system for patient-specific predictions to improve cervical intraepithelial neoplasia detection. *Biomed Res Int*. 2014;2014:341483.
230. Valasoulis G, Tsoumpou I, Founta C, Kyrgiou M, Dalkalitsis N, Nasioutziki M, et al. The role of p16(INK4a) immunostaining in the risk assessment of women with LSIL cytology: a prospective pragmatic study. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2011;32(2):150-2.
231. Gajjar K, Ahmadzai AA, Valasoulis G, Trevisan J, Founta C, Nasioutziki M, et al. Histology verification demonstrates that biospectroscopy analysis of cervical cytology identifies underlying disease more accurately than conventional screening: removing the confounder of discordance. *PLoS One*. 2014;9(1):e82416.
232. Purandare NC, Trevisan J, Patel, II, Gajjar K, Mitchell AL, Theophilou G, et al. Exploiting biospectroscopy as a novel screening tool for cervical cancer: towards a framework to validate its accuracy in a routine clinical setting. *Bioanalysis*. 2013 Nov;5(21):2697-711.
233. Kyrgiou M, Valasoulis G, Founta C, Koliopoulos G, Karakitsos P, Nasioutziki M, et al. Clinical management of HPV-related disease of the lower genital tract. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1205(1):57-68.
234. Kyrgiou M, Shafi MI. HPV vaccine. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*. 2009;19(1):26-8.
235. Stanley M, Pinto LA, Trimble C. Human papillomavirus vaccines--immune responses. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F83-7.
236. Block SL, Nolan T, Sattler C, Barr E, Giacoletti KE, Marchant CD, et al. Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in male and female adolescents and young adult women. *Pediatrics*. 2006 Nov;118(5):2135-45.
237. Petaja T, Keranen H, Karppa T, Kawa A, Lantela S, Siitari-Mattila M, et al. Immunogenicity and safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine in healthy boys aged 10-18 years. *J Adolesc Health*. 2009 Jan;44(1):33-40.
238. Tsakiroglou M, Bakalis M, Valasoulis G, Paschopoulos M, Koliopoulos G, Paraskevaidis E. Women's knowledge and utilization of gynecological cancer prevention services in the Northwest of Greece. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2011;32(2):178-81.
239. Dillner J, Kjaer SK, Wheeler CM, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, et al. Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal intraepithelial neoplasia and anogenital warts: randomised controlled trial. *BMJ*. 2010;341:c3493.
240. Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Gonzalez P, Kreimer AR, et al. Prevention of persistent human papillomavirus infection by an HPV16/18 vaccine: a community-based randomized clinical trial in Guanacaste, Costa Rica. *Cancer Discov*. 2011 Oct;1(5):408-19.
241. Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. 2009 Jul 25;374(9686):301-14.
242. Roteli-Martins CM, Naud P, De Borja P, Teixeira JC, De Carvalho NS, Zahaf T, et al. Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: up to 8.4 years of follow-up. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 Mar;8(3):390-7.
243. Schiller JT, Castellsague X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F123-38.

244. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer*. 2006 Dec 4;95(11):1459-66.
245. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med*. 2007 May 10;356(19):1928-43.
246. Munoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Mar 3;102(5):325-39.
247. Kemp TJ, Hildesheim A, Safaeian M, Dauner JG, Pan Y, Porras C, et al. HPV16/18 L1 VLP vaccine induces cross-neutralizing antibodies that may mediate cross-protection. *Vaccine*. 2011 Mar 3;29(11):2011-4.
248. Malagon T, Drolet M, Boily MC, Franco EL, Jit M, Brisson J, et al. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012 Oct;12(10):781-9.
249. Serrano B, Alemany L, Tous S, Bruni L, Clifford GM, Weiss T, et al. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect Agent Cancer*. 2012;7(1):38.
250. Dochez C, Bogers JJ, Verhelst R, Rees H. HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. *Vaccine*. 2014 Mar 20;32(14):1595-601.
251. Paraskevaidis E, Kaponis A, Malamou-Mitsi V, Davidson EJ, Hirsch PM, Koliopoulos G, et al. The natural history of HPV infection of the uterine cervix. Long-term observational and histological data. *Anticancer Res*. 2002 Mar-Apr;22(2B):1177-81.
252. Cirisano FD. Management of pre-invasive disease of the cervix. *Semin Surg Oncol*. 1999 Apr-May;16(3):222-7.
253. WHO. WHO Guidelines for Screening and Treatment of Precancerous Lesions for Cervical Cancer Prevention. Geneva: World Health Organization. 2013.
254. Colposcopy and Programme Management. Guidelines for the NHS Cervical Screening Programme. Second ed: NHSCSP Publication 2010.
255. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *J Low Genit Tract Dis*. 2007 Oct;11(4):223-39.
256. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests. *J Low Genit Tract Dis*. 2007 Oct;11(4):201-22.
257. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Oct;197(4):346-55.
258. Wadehra V, Johnson SJ. Comments on 'The revised BSCC terminology for abnormal Cervical Cytology'. *Cytopathology*. 2008 Dec;19(6):400-1.
259. Canfell K, Kang YJ, Clements M, Moa AM, Beral V. Normal endometrial cells in cervical cytology: systematic review of prevalence and relation to significant endometrial pathology. *J Med Screen*. 2008;15(4):188-98.
260. Rosenthal AN, Panoskaltsis T, Smith T, Soutter WP. The frequency of significant pathology in women attending a general gynaecological service for postcoital bleeding. *BJOG*. 2001 Jan;108(1):103-6.
261. Bigrigg MA, Codling BW, Pearson P, Read MD, Swingler GR. Colposcopic diagnosis and treatment of cervical dysplasia at a single clinic visit. Experience of low-voltage diathermy loop in 1000 patients. *Lancet*. 1990 Jul 28;336(8709):229-31.

262. TOMBOLA Group. Cytological surveillance compared with immediate referral for colposcopy in management of women with low grade cervical abnormalities: multicentre randomised controlled trial. *BMJ*. 2009;339:b2546.
263. Bolger BS, Lewis BV. A prospective study of colposcopy in women with mild dyskaryosis or koilocytosis. *Br J Obstet Gynaecol*. 1988 Nov;95(11):1117-9.
264. Hirschowitz L, Raffle AE, Mackenzie EF, Hughes AO. Long term follow up of women with borderline cervical smear test results: effects of age and viral infection on progression to high grade dyskaryosis. *BMJ*. 1992 May 9;304(6836):1209-12.
265. Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Feb 21;93(4):293-9.
266. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecol Oncol*. 2005 Dec;99(3 Suppl 1):S7-11.
267. Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Feb 18;96(4):280-93.
268. Arbyn M, Dillner J, Van Ranst M, Buntinx F, Martin-Hirsch P, Paraskevaidis E. Re: Have we resolved how to triage equivocal cervical cytology? *J Natl Cancer Inst*. 2004 Sep 15;96(18):1401-2; author reply 2.
269. Soutter WP, Wisdom S, Brough AK, Monaghan JM. Should patients with mild atypia in a cervical smear be referred for colposcopy? *Br J Obstet Gynaecol*. 1986 Jan;93(1):70-4.
270. Contreras-Melendez L, Herbert A, Millward-Sadler GH, Moore IE, Masson GM, Camillieri AP, et al. Assessment of the accuracy of cytology in women referred for colposcopy and biopsy: the results of a 1 year audit. *Cytopathology*. 1992;3(5):267-74.
271. Flannelly G, Campbell MK, Meldrum P, Torgerson DJ, Templeton A, Kitchener HC. Immediate colposcopy or cytological surveillance for women with mild dyskaryosis: a cost effectiveness analysis. *J Public Health Med*. 1997 Dec;19(4):419-23.
272. Giles JA, Deery A, Crow J, Walker P. The accuracy of repeat cytology in women with mildly dyskaryotic smears. *Br J Obstet Gynaecol*. 1989 Sep;96(9):1067-70.
273. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Kehoe S, Flannelly G, Mitrou S, et al. Management of minor cervical cytological abnormalities: a systematic review and a meta-analysis of the literature. *Cancer Treat Rev*. 2007 Oct;33(6):514-20.
274. Shafi MI, Luesley DM, Jordan JA, Dunn JA, Rollason TP, Yates M. Randomised trial of immediate versus deferred treatment strategies for the management of minor cervical cytological abnormalities. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997 May;104(5):590-4.
275. Walker EM, Dodgson J, Duncan ID. Does mild atypia on a cervical smear warrant further investigation? *Lancet*. 1986 Sep 20;2(8508):672-3.
276. Nasioutziki M, Daniilidis A, Dinas K, Kyrgiou M, Valasoulis G, Loufopoulos PD, et al. The evaluation of p16INK4a immunoexpression/immunostaining and human papillomavirus DNA test in cervical liquid-based cytological samples. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Jan;21(1):79-85.
277. Benedet JL, Matisic JP, Bertrand MA. An analysis of 84244 patients from the British Columbia cytology-colposcopy program. *Gynecol Oncol*. 2004 Jan;92(1):127-34.
278. Ferriman A. Audit shows weaknesses in cervical cancer screening. *BMJ*. 2001 May 12;322(7295):1141.
279. Sasieni PD, Cuzick J, Lynch-Farmery E. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. *The National Co-*

- ordinating Network for Cervical Screening Working Group. *Br J Cancer*. 1996 Apr;73(8):1001-5.
280. Cullimore J, Scurr J. The abnormal glandular smear: cytologic prediction, colposcopic correlation and clinical management. *J Obstet Gynaecol*. 2000 Jul;20(4):403-7.
 281. Kennedy AW, Salmieri SS, Wirth SL, Biscotti CV, Tuason LJ, Travarca MJ. Results of the clinical evaluation of atypical glandular cells of undetermined significance (AGCUS) detected on cervical cytology screening. *Gynecol Oncol*. 1996 Oct;63(1):14-8.
 282. Mohammed DK, Lavie O, de BLA, Cross P, Monaghan JM. A clinical review of borderline glandular cells on cervical cytology. *BJOG*. 2000 May;107(5):605-9.
 283. Zweizig S, Noller K, Reale F, Collis S, Resseguie L. Neoplasia associated with atypical glandular cells of undetermined significance on cervical cytology. *Gynecol Oncol*. 1997 May;65(2):314-8.
 284. Anderson DJ, Flannelly GM, Kitchener HC, Fisher PM, Mann EM, Campbell MK, et al. Mild and moderate dyskaryosis: can women be selected for colposcopy on the basis of social criteria? *BMJ*. 1992 Jul 11;305(6845):84-7.
 285. Leeson SC, Inglis TC, Salman WD. A study to determine the underlying reason for abnormal glandular cytology and the formulation of a management protocol. *Cytopathology*. 1997 Feb;8(1):20-6.
 286. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Feb 3;91(3):252-8.
 287. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1998 Apr;91(4):626-31.
 288. McIndoe WA, McLean MR, Jones RW, Mullins PR. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet Gynecol*. 1984 Oct;64(4):451-8.
 289. Coppola A, Sorosky J, Casper R, Anderson B, Buller RE. The clinical course of cervical carcinoma in situ diagnosed during pregnancy. *Gynecol Oncol*. 1997 Nov;67(2):162-5.
 290. Nevin J, Soeters R, Dehaeck K, Bloch B, van Wyk L. Cervical carcinoma associated with pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*. 1995 Mar;50(3):228-39.
 291. Nevin J, Soeters R, Dehaeck K, Bloch B, Van Wyk L. Advanced cervical carcinoma associated with pregnancy. *Int J Gynecol Cancer*. 1993 Jan;3(1):57-63.
 292. Palle C, Bangsboll S, Andreasson B. Cervical intraepithelial neoplasia in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000 Apr;79(4):306-10.
 293. Woodrow N, Permezel M, Butterfield L, Rome R, Tan J, Quinn M. Abnormal cervical cytology in pregnancy: experience of 811 cases. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1998 May;38(2):161-5.
 294. Paraskeva E, Koliopoulos G, Kalantaridou S, Pappa L, Navrozoglou I, Zikopoulos K, et al. Management and evolution of cervical intraepithelial neoplasia during pregnancy and postpartum. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002 Aug 5;104(1):67-9.
 295. Sawaya GF, Grady D, Kerlikowske K, Valleur JL, Barnabei VM, Bass K, et al. The positive predictive value of cervical smears in previously screened postmenopausal women: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS). *Ann Intern Med*. 2000 Dec 19;133(12):942-50.
 296. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson A, Frisch M, Sparen P, Ponten J, et al. Smoking and oral contraceptives as risk factors for cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer*. 1999 May 5;81(3):357-65.
 297. Harris TG, Burk RD, Palefsky JM, Massad LS, Bang JY, Anastos K, et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV serostatus, CD4 cell counts, and human papillomavirus test results. *JAMA*. 2005 Mar 23;293(12):1471-6.
 298. Maiman M, Fruchter RG, Sedlis A, Feldman J, Chen P, Burk RD, et al. Prevalence, risk factors, and accuracy of cytologic screening for cervical intraepithelial neoplasia in

- women with the human immunodeficiency virus. *Gynecol Oncol*. 1998 Mar;68(3):233-9.
299. Soutter WP, de Barros Lopes A, Fletcher A, Monaghan JM, Duncan ID, Paraskevaïdis E, et al. Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*. 1997 Apr 5;349(9057):978-80.
300. Kalliala I, Anttila A, Pukkala E, Nieminen P. Risk of cervical and other cancers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: retrospective cohort study. *BMJ*. 2005 Nov 19;331(7526):1183-5.
301. Soutter WP, Sasieni P, Panoskaltzis T, editors. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*; 2006 Apr 15.
302. Flannelly G, Bolger B, Fawzi H, De Lopes AB, Monaghan JM. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? *BJOG*. 2001 Oct;108(10):1025-30.
303. Flannelly G, Langhan H, Jandial L, Mana E, Campbell M, Kitchener H. A study of treatment failures following large loop excision of the transformation zone for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997 Jun;104(6):718-22.
304. Gardeil F, Barry-Walsh C, Prendiville W, Clinch J, Turner MJ. Persistent intraepithelial neoplasia after excision for cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Obstet Gynecol*. 1997 Mar;89(3):419-22.
305. Gardeil F, Turner MJ. A study of treatment failures following large loop excision of the transformation zone for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997 Nov;104(11):1325; author reply 6.
306. Ghaem-Maghani S, Sagi S, Majeed G, Soutter WP. Incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia and risk of treatment failure: a meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2007 Nov;8(11):985-93.
307. Mahadevan N, Horwell DH. Histological incomplete excision of CIN after large loop excision of the transformation zone (LLETZ) merits careful follow up, not retreatment. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993 Aug;100(8):794-5.
308. Paraskevaïdis E, Jandial L, Mann EM, Fisher PM, Kitchener HC. Pattern of treatment failure following laser for cervical intraepithelial neoplasia: implications for follow-up protocol. *Obstet Gynecol*. 1991 Jul;78(1):80-3.
309. Paraskevaïdis E, Kalantaridou SN, Paschopoulos M, Zikopoulos K, Diakomanolis E, Dalkalitsis N, et al. Factors affecting outcome after incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2003;24(6):541-3.
310. Paraskevaïdis E, Kitchener H, Adonakis G, Parkin D, Lolis D. Incomplete excision of CIN in conization: further excision or conservative management? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1994 Jan;53(1):45-7.
311. Paraskevaïdis E, Koliopoulos G, Malamou-Mitsi V, Zikopoulos K, Paschopoulos M, Pappa L, et al. Large loop excision of the transformation zone for treating cervical intraepithelial neoplasia: a 12-year experience. *Anticancer Res*. 2001 Jul-Aug;21(4B):3097-9.
312. Paraskevaïdis E, Lolis ED, Koliopoulos G, Alamanos Y, Fotiou S, Kitchener HC. Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after large loop excision with clear margins. *Obstet Gynecol*. 2000 Jun;95(6 Pt 1):828-31.
313. Stasinou SM, Valasoulis G, Kyrgiou M, Malamou-Mitsi V, Bilirakis E, Pappa L, et al. Large loop excision of the transformation zone and cervical intraepithelial neoplasia: a 22-year experience. *Anticancer Res*. 2012 Sep;32(9):4141-5.

314. Lopes A, Mor-Yosef S, Pearson S, Ireland D, Monaghan JM. Is routine colposcopic assessment necessary following laser ablation of cervical intraepithelial neoplasia? *Br J Obstet Gynaecol.* 1990 Feb;97(2):175-7.
315. Baldauf JJ, Dreyfus M, Ritter J, Cuenin C, Tissier I, Meyer P. Cytology and colposcopy after loop electrosurgical excision: implications for follow-up. *Obstet Gynecol.* 1998 Jul;92(1):124-30.
316. Gok M, Coupe VM, Berkhof J, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Hogewoning CJ, et al. HPV16 and increased risk of recurrence after treatment for CIN. *Gynecol Oncol.* 2007 Feb;104(2):273-5.
317. Kitchener HC, Walker PG, Nelson L, Hadwin R, Patnick J, Anthony GB, et al. HPV testing as an adjunct to cytology in the follow up of women treated for cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG.* 2008 Jul;115(8):1001-7.
318. Martin-Hirsch PP, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson HO, Keep SL. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(6):CD001318.
319. Luesley DM, McCrum A, Terry PB, Wade-Evans T, Nicholson HO, Mylotte MJ, et al. Complications of cone biopsy related to the dimensions of the cone and the influence of prior colposcopic assessment. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985 Feb;92(2):158-64.
320. Leiman G, Harrison NA, Rubin A. Pregnancy following conization of the cervix: complications related to cone size. *Am J Obstet Gynecol.* 1980 Jan 1;136(1):14-8.
321. Bostofte E, Berget A, Falck Larsen J, Hjortkjaer Pedersen P, Rank F. Conization by carbon dioxide laser or cold knife in the treatment of cervical intra-epithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1986;65(3):199-202.
322. Larsson G. Conization for preinvasive and early invasive carcinoma of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl.* 1983;114:1-40.
323. Tabor A, Berget A. Cold-knife and laser conization for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1990 Oct;76(4):633-5.
324. Murdoch JB, Grimshaw RN, Morgan PR, Monaghan JM. The impact of loop diathermy on management of early invasive cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 1992 May;2(3):129-33.
325. Wright TC, Jr., Gagnon S, Richart RM, Ferenczy A. Treatment of cervical intraepithelial neoplasia using the loop electrosurgical excision procedure. *Obstet Gynecol.* 1992 Feb;79(2):173-8.
326. Whiteley PF, Olah KS. Treatment of cervical intraepithelial neoplasia: experience with the low-voltage diathermy loop. *Am J Obstet Gynecol.* 1990 May;162(5):1272-7.
327. Luesley DM, Cullimore J, Redman CW, Lawton FG, Emens JM, Rollason TP, et al. Loop diathermy excision of the cervical transformation zone in patients with abnormal cervical smears. *BMJ.* 1990 Jun 30;300(6741):1690-3.
328. Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ). A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989 Sep;96(9):1054-60.
329. Jordan JA, Woodman CB, Mylotte MJ, Emens JM, Williams DR, MacAlary M, et al. The treatment of cervical intraepithelial neoplasia by laser vaporization. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985 Apr;92(4):394-8.
330. Benedet JL, Nickerson KG, White GW. Laser therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1981 Aug;58(2):188-91.
331. Hatch KD, Shingleton HM, Austin JM, Jr., Soong SJ, Bradley DH. Cryosurgery of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1981 Jun;57(6):692-8.
332. Kaufman RH, Irwin JF. The cryosurgical therapy of cervical intraepithelial neoplasia. III. Continuing follow-up. *Am J Obstet Gynecol.* 1978 Jun 15;131(4):381-8.
333. Popkin DR, Scali V, Ahmed MN. Cryosurgery for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 1978 Mar 1;130(5):551-4.

334. Ostergard DR. Cryosurgical treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1980 Aug;56(2):231-3.
335. Creasman WT, Hinshaw WM, Clarke-Pearson DL. Cryosurgery in the management of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1984 Feb;63(2):145-9.
336. Halperin DT, Steiner MJ, Cassell MM, Green EC, Hearst N, Kirby D, et al. The time has come for common ground on preventing sexual transmission of HIV. *Lancet.* 2004 Nov 27-Dec 3;364(9449):1913-5.
337. Wald A, Langenberg AG, Krantz E, Douglas JM, Jr., Handsfield HH, DiCarlo RP, et al. The relationship between condom use and herpes simplex virus acquisition. *Ann Intern Med.* 2005 Nov 15;143(10):707-13.
338. Warner L, Macaluso M, Newman D, Austin H, Kleinbaum D, Kamb M, et al. Condom effectiveness for prevention of *C trachomatis* infection. *Sex Transm Infect.* 2006 Jun;82(3):265.
339. Warner L, Stone KM, Macaluso M, Buehler JW, Austin HD. Condom use and risk of gonorrhea and Chlamydia: a systematic review of design and measurement factors assessed in epidemiologic studies. *Sex Transm Dis.* 2006 Jan;33(1):36-51.
340. Steiner MJ, Cates W, Jr. Condoms and sexually-transmitted infections. *N Engl J Med.* 2006 Jun 22;354(25):2642-3.
341. Tobian AA, Charvat B, Ssempijja V, Kigozi G, Serwadda D, Makumbi F, et al. Factors associated with the prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection among men in Rakai, Uganda. *J Infect Dis.* 2009 Apr 1;199(7):945-9.
342. Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis.* 2002 Nov;29(11):725-35.
343. Bleeker MC, Hogewoning CJ, Voorhorst FJ, van den Brule AJ, Snijders PJ, Starink TM, et al. Condom use promotes regression of human papillomavirus-associated penile lesions in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2003 Dec 10;107(5):804-10.
344. van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer.* 2002 Apr 1;98(4):590-5.
345. Hogewoning CJ, Bleeker MC, van den Brule AJ, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer.* 2003 Dec 10;107(5):811-6.
346. Baldwin SB, Wallace DR, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Vaught LC, Giuliano AR. Condom use and other factors affecting penile human papillomavirus detection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis.* 2004 Oct;31(10):601-7.
347. Tobian AA, Serwadda D, Quinn TC, Kigozi G, Gravitt PE, Laeyendecker O, et al. Male circumcision for the prevention of HSV-2 and HPV infections and syphilis. *N Engl J Med.* 2009 Mar 26;360(13):1298-309.
348. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 2006 Jun 22;354(25):2645-54.
349. Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, Diakomanolis E, Martin-Hirsch P, Koliopoulos G, et al. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev.* 2004 Apr;30(2):205-11.
350. Paraskevaidis E, Davidson EJ, Koliopoulos G, Alamanos Y, Lolis E, Martin-Hirsch P. Bleeding after loop electrosurgical excision procedure performed in either the

- follicular or luteal phase of the menstrual cycle: a randomized trial. *Obstet Gynecol.* 2002 Jun;99(6):997-1000.
351. Martin-Hirsch PL, Paraskevaïdis E, Kitchener H. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(2):CD001318.
 352. Prendiville W. Large loop excision of the transformation zone. *Clinical Obstetrics and Gynecology.* 1995;38(3):622-39.
 353. Paraskevaïdis E, Koliopoulos G, Paschopoulos M, Stefanidis K, Navrozoglou I, Lolis D. Effects of ball cauterization following loop excision and follow-up colposcopy. *Obstet Gynecol.* 2001 Apr;97(4):617-20.
 354. Founta C, Arbyn M, Valasoulis G, Kyrgiou M, Tsili A, Martin-Hirsch P, et al. Proportion of excision and cervical healing after large loop excision of the transformation zone for cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG.* 2010 Nov;117(12):1468-74.
 355. Papoutsis D, Daskalakis G, Antonakou A, Rodolakis A, Mesogitis S, Antsaklis A. Sonographic measurement of cervical volume in nonpregnant women using the geometric formula for a cylinder versus the three-dimensional automated virtual organ computer-aided analysis (vocal). *J Clin Ultrasound.* 2011 Jul;39(6):322-8.
 356. Papoutsis D, Rodolakis A, Mesogitis S, Sotiropoulou M, Antsaklis A. Regeneration of uterine cervix at 6 months after large loop excision of the transformation zone for cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG.* 2012 May;119(6):678-84.
 357. Ang C, Mukhopadhyay A, Burnley C, Faulkner K, Cross P, Martin-Hirsch P, et al. Histological recurrence and depth of loop treatment of the cervix in women of reproductive age: incomplete excision versus adverse pregnancy outcome. *BJOG.* 2011 May;118(6):685-92.
 358. Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, Raifu AO, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *BMJ.* 2008;337:a1284.
 359. Jakobsson M, Gissler M, Paavonen J, Tapper AM. Loop electrosurgical excision procedure and the risk for preterm birth. *Obstetrics and Gynecology.* 2009;114(3):504-10.
 360. Noehr B, Jensen A, Frederiksen K, Tabor A, Kjaer SK. Depth of cervical cone removed by loop electrosurgical excision procedure and subsequent risk of spontaneous preterm delivery. *Obstet Gynecol.* 2009 Dec;114(6):1232-8.
 361. Noehr B, Jensen A, Frederiksen K, Tabor A, Kjaer SK. Loop electrosurgical excision of the cervix and subsequent risk for spontaneous preterm delivery: a population-based study of singleton deliveries during a 9-year period. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Jul;201(1):33 e1-6.
 362. Ortoft G, Henriksen T, Hansen E, Petersen L. After conisation of the cervix, the perinatal mortality as a result of preterm delivery increases in subsequent pregnancy. *BJOG.* 2010 Feb;117(3):258-67.
 363. Arbyn M, Kyrgiou M, Gondry J, Petry KU, Paraskevaïdis E. Long term outcomes for women treated for cervical precancer. *BMJ.* 2014;348:f7700.
 364. Kyrgiou M, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Paraskevaïdis E. Increased risk of preterm birth after treatment for CIN. *BMJ.* 2012;345:e5847.
 365. Kyrgiou M, Tsoumpou I, Vrekoussis T, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, et al. The up-to-date evidence on colposcopy practice and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: the Cochrane colposcopy & cervical cytopathology collaborative group (C5 group) approach. *Cancer Treat Rev.* 2006 Nov;32(7):516-23.
 366. Jakobsson M, Gissler M, Sainio S, Paavonen J, Tapper AM. Preterm delivery after surgical treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 2007 Feb;109(2 Pt 1):309-13.

367. Noehr B, Jensen A, Frederiksen K, Tabor A, Kjaer SK. Loop electrosurgical excision of the cervix and risk for spontaneous preterm delivery in twin pregnancies. *Obstetrics and Gynecology*. 2009;114(3):511-5.
368. Valasoulis G, Koliopoulos G, Founta C, Kyrgiou M, Tsoumpou I, Valari O, et al. Alterations in human papillomavirus-related biomarkers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2011 Apr;121(1):43-8.
369. Valasoulis G, Stasinou SM, Nasioutziki M, Athanasiou A, Zografou M, Spathis A, et al. Expression of HPV-related biomarkers and grade of cervical intraepithelial lesion at treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2013 Oct 31.
370. Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Apr 20;97(8):577-86.
371. Sawaya GF, McConnell KJ, Kulasingam SL, Lawson HW, Kerlikowske K, Melnikow J, et al. Risk of cervical cancer associated with extending the interval between cervical-cancer screenings. *N Engl J Med*. 2003 Oct 16;349(16):1501-9.
372. Bosch FX. Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer prevention. *Salud Publica Mex*. 2003;45 Suppl 3:S326-39.
373. FUTUREII S. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med*. 2007 May 10;356(19):1915-27.
374. Schwarz TF, Spaczynski M, Schneider A, Wysocki J, Galaj A, Schulze K, et al. Persistence of immune response to HPV-16/18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine in women aged 15-55 years. *Hum Vaccin*. 2011 Sep;7(9):958-65.
375. Castellsague X, Munoz N, Pitisuttithum P, Ferris D, Monsonego J, Ault K, et al. End-of-study safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in adult women 24-45 years of age. *Br J Cancer*. 2011 Jun 28;105(1):28-37.
376. Munoz N, Manalastas R, Jr., Pitisuttithum P, Tresukosol D, Monsonego J, Ault K, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24-45 years: a randomised, double-blind trial. *Lancet*. 2009 Jun 6;373(9679):1949-57.
377. Rodriguez AC, Solomon D, Herrero R, Hildesheim A, Gonzalez P, Wacholder S, et al. Impact of human papillomavirus vaccination on cervical cytology screening, colposcopy, and treatment. *Am J Epidemiol*. 2013 Sep 1;178(5):752-60.
378. Romanowski B, Schwarz TF, Ferguson LM, Peters K, Dionne M, Schulze K, et al. Immunogenicity and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine administered as a 2-dose schedule compared with the licensed 3-dose schedule: results from a randomized study. *Hum Vaccin*. 2011 Dec;7(12):1374-86.
379. Szarewski A, Poppe WA, Skinner SR, Wheeler CM, Paavonen J, Naud P, et al. Efficacy of the human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine in women aged 15-25 years with and without serological evidence of previous exposure to HPV-16/18. *Int J Cancer*. 2011 Jul 1;131(1):106-16.
380. Valari O, Koliopoulos G, Karakitsos P, Valasoulis G, Founta C, Godevenos D, et al. Human papillomavirus DNA and mRNA positivity of the anal canal in women with lower genital tract HPV lesions: predictors and clinical implications. *Gynecol Oncol*. 2011 Sep;122(3):505-8.