

Streszczenie

Rozpoznanie cytologiczne atypowych komórek nabłonkowych o nieokreślonym znaczeniu ASC-US jest najczęściej stawianym rozpoznaniem zarówno w Polsce jak i na świecie.

W profilaktyce raka szyjki macicy w prowadzonych badaniach skryningowych sposób postępowania w przypadkach uzyskania nieprawidłowych wyników badania cytologicznego jest ustalony, jednak nadal wywołuje liczne kontrowersje. Dotyczą one zarówno wypracowania systemu weryfikującego nieprawidłowe wyniki jak i ułomności stosowanych metod. Dlatego też w prowadzonej aktualnie profilaktyce raka szyjki macicy powinno się wdrażać postępowanie zmierzające do jak najprecyzyjniejszej diagnostyki.

Dotyczy to zwłaszcza wyjaśnienia wątpliwości związanych z najczęściej stawianym rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.

Cel pracy

Mając do dyspozycji grupę kobiet, które zgłosiły się do weryfikacji nieprawidłowych wyników badania cytologicznego ASC-US uzyskanych w rozmazach pobranych w ramach przeprowadzanych w Poradniach K badań profilaktycznych raka szyjki macicy, postanowiono uzyskać odpowiedź na następujące pytania:

1. Z jakim prawdopodobieństwem pod stawianym przez cytologa rozpoznaniem ASC-US kryje się śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy i czy zakażenie HPV zwiększa to prawdopodobieństwo?
2. Czy rozpoznanie ASC-US, przy ujemnych wynikach testów na HPV, wyklucza obecność w szyjce patologii pod postacią śródnabłonkowej neoplazji?
3. Jaką przydatność posiada badanie kolposkopowe w procesie weryfikacji rozmazów ASC-US?
4. Jaką rolę w stawianiu przez cytologa rozpoznań ASC-US odgrywają takie czynniki jak wiek badanych kobiet i stan biocenozy pochwy?

Materiał i metodyka

Badaniami objęto 641 kobiet w wieku od 21 do 68 roku życia, które w okresie od 2007 do 2011 roku były kierowane z Poradni Rejonowych K do Poradni Ginekologicznej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach celem dokonania weryfikacji wyników rozmazów cytologicznych pobranych z szyjki macicy - ASC-US (ang. atypical squamous cells of undetermined significance).

Do badania nie kwalifikowano kobiet z wynikami cytologicznymi ASC-H (ang. atypical squamous cells-cannot exclude HSIL), LSIL (ang. low-grade squamous intraepithelial lesion) i HSIL (ang. high-grade squamous intraepithelial lesion). Wszystkie kobiety wyraziły zgodę na udział w badaniu. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jana Kochanowskiego (nr 13/2012).

Każdej kobiecie **oglądano szyjkę macicy** we wzierniku pobierając jednocześnie treść pochwową celem wykonania testów hybrydyzacyjnych HPV DNA.

Badania wirusologiczne wykonano w Zakładzie Mikrobiologii Świętokrzyskiego Centrum Onkologii używając testów hybrydyzacyjnych (HC) z sondami RNA używając testu Amplicor Human Papillomavirus Roche Diagnostic. Procedura badania oparta była na metodzie real time PCR i identyfikowała DNA najczęściej występujących wysokoonkogennych typów HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 68.

Każdej kobiecie dokonano wstępną **ocenę biocenozy pochwy** mierząc pH treści pochwowej. W przypadkach gdy odczyn pH wynosił 5 lub był wyższy pobierano treść pochwową do badania bakterioskopowego, którym oceniano stopnie czystości pochwy w 4-stopniowej skali podanej przez Kuczyńską. Treść pochwową do badania bakterioskopowego pobierano jałową szpatułką, umieszczano na mikroskopowym szkiełku podstawowym, utrwalano nad płomieniem i barwiono metodą Gramma. Preparaty oglądano pod powiększeniem imersyjnym (1000x).

Gdy odczyn pH wynosił 4,5 lub był niższy odstępowano od badań bakterioskopowych przyjmując, że stan biocenozy pochwy w tych przypadkach jest prawidłowy i odpowiada I lub II stopniowi czystości pochwy.

Do **diagnostyki cytologicznej** rozmazy pobierano polietylenową szczoteczką jednorazowego użytku typu Cyto-Brush. Ocenę rozmazów prowadzono zgodnie z klasyfikacją systemu Bethesda 2001.

Badanie kolposkopowe przeprowadzano w trzech etapach.

Oceniając szyjkę macicy w kolposkopie zwracano uwagę na jej barwę, ukształtowanie powierzchni oraz na lokalizację ewentualnych zmian nabłonkowych. Dokonywano oceny podnabłonkowego łożyska naczyniowego używając dużych powiększeń kolposkopu i wprowadzając w wiązkę światła filtr zielony.

Ocenę obrazów kolposkopowych prowadzono zgodnie z międzynarodową klasyfikacją obrazów kolposkopowych zaproponowaną na kongresie IFCPC (Międzynarodowa Federacja Patologii Szyjki Macicy i Kolposkopii) w Rio de Janeiro w 2011 roku.

Materiał tkankowy do **badania histopatologicznego** pacjentkom zakwalifikowanym do biopsji pobierano z części pochwowej szyjki macicy i z kanału szyjki posługując się albo wycinkiem celowanym albo procedurą LEEP (ang. loop electrosurgical excision procedure).

Po utrwaleniu materiału biopsyjnego w buforowanym roztworze formaliny celem dalszego opracowania przekazywano go do Zakładu Patologii Nowotworów.

Analizę statystyczną zgromadzonych wyników badań wykonano posługując się pakietem Statistica w wersji 9.1 PL. Stosowano następujące metody statystyczne:

- test chi – kwadrat niezależności Pearsona
- współczynnik kappa – do określenia zgodności wyników dwóch badań.

W analizie statystycznej jako istotne przyjęto efekty, dla których poziom prawdopodobieństwa p był mniejszy od przyjętego poziomu istotności $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$).

Wyniki badań i omówienie

Po uzyskaniu wyników testów hybrydacyjnych DNA HPV kobiety podzielono na dwie grupy badawcze:

Grupa I - 463 kobiety niezakażone wirusem Papilloma.

Grupa II - 178 kobiet z uzyskanymi w treści pochwowej dodatnimi wynikami testów hybrydacyjnych na HPV DNA.

U kobiet **Grupy I**, tzn u kobiet z ASC-US niezakażonych HPV, na skutek przeprowadzonych badań takich jak wziernikowanie pochwy, kolposkopia i kontrolne badanie cytologiczne 9 pacjentek zakwalifikowano do biopsji szyjki, w wyniku której w 0,8% przypadków wykryto śródnabłonkową neoplazję szyjki macicy.

Przekonano się w ten sposób, że rozpoznanie cytologiczne ASC-US, nawet przy ujemnych wynikach HPV, nie wyklucza obecności w szyjce macicy zmian nabłonkowych o charakterze CIN.

W wyniku przeprowadzonej weryfikacji kolposkopowej i histopatologicznej u kobiet **Grupy II** okazało się, że śródnabłonkową neoplazję szyjki macicy wykryto u 37,4% badanych kobiet tej grupy.

Przedstawione powyżej dane dotyczące Grupy I i Grupy II wyraźnie wskazują na to, że w ok. 8% przypadków rozpoznanie cytologiczne ASC-US wiąże się z obecnością w szyjce macicy śródnabłonkowej neoplazji. Największe jednak prawdopodobieństwo rozwoju CIN, dotyczące 1/3 przypadków, występuje u kobiet gdy rozpoznaniu ASC-US towarzyszy zakażenie HPV.

Analizując przydatność badania kolposkopowego w procesie weryfikacji nieprawidłowych wyników cytologicznych ASC-US zaobserwowano, że stwierdzenie prawidłowych obrazów kolposkopowych u kobiet z ASC-US niezakażonych wirusami Papilloma nie wiąże się z rozpoznaniem CIN i pozwala na zakwalifikowanie tych kobiet do dalszych rutynowych badań profilaktycznych. Do dalszych rutynowych badań profilaktycznych można zakwalifikować również kobiety z ASC-US, mimo że są zakażone HPV, ale legitymują się prawidłowymi wynikami kolposkopii i nie posiadają na szyjce ertroplakii.

Natomiast stwierdzenie nieprawidłowych obrazów kolposkopowych zarówno u kobiet niezakażonych HPV jak i zakażonych wymaga dalszej weryfikacji histopatologicznej. Weryfikacji histopatologicznej wymagają również kobiety zakażone HPV mimo stwierdzenia obrazów kolposkopowych prawidłowych ale z widoczną na szyjce rozległą erytroplakią. U 7 takich kobiet rozpoznano śródnabłonkową neoplazję szyjki macicy.

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto sugestię, że w diagnostyce zmian patologicznych szyjki macicy, ani ocena kolposkopowa ani testy hybrydyzacyjne DNA HPV nie powinny być stosowane oddzielnie. Dokonana bowiem analiza statystyczna wykazała, że w 56,9% wyniki kolposkopii i oceny wirusologicznej nie są do końca zgodne, o czym świadczy również wartość obliczonego współczynnika kappa wynoszącego 0,185. Obydwa badania należy więc wykonywać jednocześnie.

Mimo, że test DNA HPV okazał się bardziej czuły niż kolposkopia to z analizy statystycznej wynika, że pozostałe cechy tych testów, tj. swoistość oraz wartość predykcyjna dodatnia i ujemna są znacznie niższe niż ocena kolposkopowa. Wprawdzie okazało się, że badanie kolposkopowe jest w stanie na 100 przypadków prawidłowo zdiagnozować 82, a ocena wirusologiczna 92, to biorąc jednak pod uwagę wartości predykcyjne dodatnie wykazano, że w przypadku kolposkopii wynik wskazujący na istnienie w szyjce macicy dysplazji jest wiarygodny w 75,6%, natomiast w przypadku dodatniego testu DNA HPV pewność pacjentki, że jest chora wynosi tylko 60,8%.

Analizując rolę jaką w częstości uzyskiwania nieprawidłowych wyników rozmazów cytologicznych ASC-US odgrywa czynnik wieku i stan biocenozy pochwy przekonano się, że odsetki kobiet z wynikami badania cytologicznego ASC-US i dodatnimi wynikami testów hybrydyzacyjnych HPV DNA w obu grupach wiekowych kobiet są zbliżone (29,2% i 20,2%) Można więc przyjąć, że infekcja HPV szyjki macicy, zarówno u kobiet młodych jak i po menopauzie w jednakowym stopniu wpływa na rozpoznanie w rozmazach komórek atypowych o nieokreślonym znaczeniu.

Przeprowadzona ocena biocenozy pochwy u wszystkich poddanych weryfikacji kobiet z ASC-US wykazała w pochwie u 52,7% pacjentek stan prawidłowy, a u 47,3% obrazy bakterioskopowe świadczące o istnieniu stanu zapalnego.

Uzyskane dane nie pozwoliły więc ani na wykluczenie ani na potwierdzenie wpływu zakażeń bakteryjnych pochwy na interpretację morfologii obserwowanych w rozmazach komórek, a co za tym idzie na częstość rozpoznawania przez cytologa komórek atypowych o nieokreślonym znaczeniu.

U kobiet z prawidłową biocenozą pochwy stwierdzono podobny odsetek 26,3% kobiet zakażonych HPV jak i u kobiet z zaburzoną biocenozą pochwy 29,3%.

Przedstawione wyniki nie dają podstaw do twierdzenia, że decydującym czynnikiem utrudniającym interpretację rozmazów cytologicznych i powodującym, że cytolog zamiast stawiać konkretną diagnozę rozpoznaje komórki atypowe o nieokreślonym znaczeniu jest bakteryjne, wirusowe lub mieszane zakażenie pochwy.

Analizując zatem wyniki całości materiału własnego sformułowano następujące wnioski:

1. Rozpoznanie cytologiczne ASC-US w około 8 % przypadków wiąże się z obecnością w szyjce macicy śród nabłonkowej neoplazji. Największe prawdopodobieństwo rozwoju CIN, dotyczące jednej trzeciej przypadków, występuje u kobiet gdy rozpoznaniem ASC-US towarzyszy zakażenie HPV.
2. Rozpoznanie ASC-US przy ujemnych wynikach testów na HPV nie wyklucza całkowicie obecności w szyjce macicy śród nabłonkowej neoplazji, jednak prawdopodobieństwo takie jest niewielkie.
3. Przydatność kolposkopii w procesie weryfikacji nieprawidłowych wyników rozmazów cytologicznych ASC-US jest duża. Stwierdzenie podejrzanych obrazów kolposkopowych u kobiet z ASC-US wiąże się z dużym prawdopodobieństwem rozwoju w szyjce zmian dysplastycznych i wymaga następnej weryfikacji histopatologicznej.
4. Wiek kobiet i stan biocenozy pochwy nie wpływa na interpretację niejasnej morfologii obserwowanych w rozmazach komórek, a więc na częstość rozpoznawania przez cytologa komórek atypowych o nieokreślonym znaczeniu.
5. Optymalnym postępowaniem w procesie weryfikacji nieprawidłowych wyników rozmazów cytologicznych ASC-US jest skojarzona cytologiczno-kolposkopowo-wirusowa diagnostyka zmian szyjki macicy.

Summary

Cytological diagnosis of atypical epithelial cells of undetermined significance (ASC-US) is the most common diagnosis both in Poland and in the world.

In the prevention of cervical cancer conducted by means of screening tests the procedure applied in the cases of obtaining abnormal Pap test result is fixed, however, it still causes much controversy which refers both to the development of the verification system of abnormalities and deficiencies of applied methods. Therefore, within the current prevention procedures of cervical cancer the tests aiming at the most precise diagnosis should be implemented.

This applies particularly to the clarification of doubts related to the most common cytological diagnosis of ASC-US.

The objective of the work

Working with a group of women who were selected in order to verify the abnormal ASC-US cytology resulting in smears taken during preventive examinations for cervical cancer conducted at K Clinics the following research questions were posed:

1. What is the probability of the occurrence of cervical intraepithelial neoplasia in the ASC-US cytology and does the HPV infection increase the likelihood of such an occurrence?
2. Does the ASC-US, together with the negative test results for HPV, exclude the presence of pathology in the cervix in the form of intraepithelial neoplasia?
3. What is the usefulness of colposcopy in the process of verification of ASC-US smears?
4. What role of such factors as the age of the women and the state of vaginal flora in the diagnosis of ASC-US?

Material and methodology

The study included 641 women aged 21 to 68, who in the period from 2007 to 2011 were sent from District K Clinics to the Gynecological Clinic of the Holy Cross Cancer Center in Kielce for the verification of results of smears taken from the cervix - ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance).

The study did not include women with cytological results of ASC-H (atypical squamous cells-cannot exclude HSIL), LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion) and HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion). All the women gave informed consent to participate in the study. In order to carry out the study an approval was obtained from the Bioethics Committee of the Faculty of Health Sciences at the University of Jan Kochanowski (No. 13/2012).

Every woman's cervix was examined through a sighting tube and the contents of vaginal discharge were collected for HPV DNA hybridization tests.

Viral tests were performed at the Department of Microbiology of the Holy Cross Cancer Center using the hybridization tests (HC) with RNA probes applying the Amplicor Human Papillomavirus Roche Diagnostics test. The test procedure was based on the PCR real time method and identified the DNA of the most common HPV types including: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 68.

A preliminary assessment of vaginal flora was made for every woman measuring the pH of the vaginal content. In cases where the pH was 5 or higher the vaginal content was collected for bacterial microscopic testing to assess the degree of purity of the vagina in a 4-point scale provided by Kuczyńska. The vaginal content for the bacterial microscopic testing was collected with a sterile spatula, then placed on a microscopic glass slide, fixed over a flame and stained by means of the Gramma method. The samples were viewed under immersion magnification (1000x).

In the cases when the pH was 4.5 or lower bacterial-microscopic tests were not performed, accepting that the condition of vaginal flora in these cases is correct and corresponds to the I or II degree of purity of the vagina.

For the purpose of the cytological diagnosis smears were collected with a disposable polyethylene brush of Cyto-Brush type. The evaluation of smears was carried out according to the classification system of Bethesda 2001.

Colposcopy was carried out in three stages.

Assessing the cervix during colposcopy special attention was paid to its color, shape of the surface and the location of possible changes in epithelial cells. The sub-epithelial vasculature was assessed using a high-magnification colposcope and introducing a green filter into a beam of light.

The evaluation of colposcopy images was carried out according to the international classification of colposcopy images proposed at the IFCPC congress (International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy) in Rio de Janeiro in 2011.

Tissue material for histopathological examination of the patients selected for biopsy was taken from the vaginal part of the cervix and cervical canal using either a targeted section or the LEEP procedure (loop electrosurgical excision procedure).

After applying buffered formalin solution in order to further develop the tissue samples they were sent to the Department of Tumor Pathology.

The statistical analysis of the collected test results was performed using Statistica package version 9.1 PL. The statistical methods used were as follows:

- chi-squared test - Pearson independence square.
- kappa factor - to determine the compatibility of the results of the two studies.

In the statistical analysis, effects considered significant were those for which the level of probability p was less than the accepted level of significance $\alpha = 0.05$ ($p < 0.05$).

Study results and their discussion

After obtaining the results of the DNA HPV hybridization tests, the women were divided into two groups:

Group I - 463 women with no human papillomavirus infection.

Group II - 178 women with positive hybridization tests results for HPV DNA.

In **Group I** comprising women with ASC-US but not infected with HPV, following colposcopy and control cytological examination, 9 patients were classified for a cervical biopsy as a result of which in 0.8% cases intraepithelial neoplasia was detected.

It was discovered that a cytological diagnosis of ASC-US, even with HPV-negative results, does not exclude the presence of epithelial changes of CIN nature in the cervix.

As a result of the colposcopic and histopathological verification in women from **Group II** intraepithelial neoplasia was detected in 37.4% of the women in this group.

The above data related to Group I and Group II clearly show that in approx. 8% of the cases cytological diagnosis ASC-US is connected with the presence of cervical intraepithelial neoplasia. The greatest risk of developing CIN related to about 1/3 of the cases is present in women when the ASC-US diagnosis was accompanied by HPV infection.

Analyzing the suitability of colposcopy in the process of verification of abnormal ASC-US cytology, it was observed that the determination of normal colposcopy images of women with ASC-US uninfected with Papilloma virus is not associated with a diagnosis of CIN and allows for the classification of these women to continue further routine preventive examinations. Women with ASC-US can also be qualified for further checkups, even though they are infected with HPV, however, they have normal colposcopy results and there is no erythroplakia detected in their cervix.

The diagnosis of abnormal colposcopy images in both HPV uninfected and infected women requires further histopathological verification. Histopathological verification is also required in women infected with HPV, despite the occurrence of normal colposcopy images but with visible extensive erythroplakia in the cervix. 7 such women were diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia.

Based on the conducted study, it was suggested that in the diagnosis of lesions of the cervix neither the evaluation of colposcopy nor HPV DNA hybridization tests should be use separately. The performed statistical analysis showed that 56.9% of colposcopy results and viral assessments are not entirely consistent, which is also testified by the value of the calculated kappa ratio of 0.185. Both test should therefore be carried out simultaneously.

Although the HPV DNA test was more sensitive than colposcopy, the statistical analysis shows that other properties of these tests, i.e. specificity and positive and negative predictive value are much lower than colposcopy. Although it turned out that by means of colposcopy 82 cases out of 100 in were diagnosed correctly (for viral assessment the ratio was 92) then taking into account the positive predictive value it was shown that in the case of colposcopy the result indicating the occurrence of cervical dysplasia is credible in 75.6 % of cases and in the case of a positive HPV DNA test the certainty that a patient was ill was only 60.8%.

Analyzing the role of age and the condition of vaginal flora in the frequency of obtaining abnormal ASC-US smears it was discovered that the percentage of women with the ASC-US cytology results and positive hybridization HPV DNA test results in both groups of women were similar (29, 2% and 20.2% respectively). Therefore it can be assumed that HPV infection of the cervix, both in young women and postmenopausal ones equally affects the detection of atypical cells of undetermined significance in the smears.

The evaluation of vaginal flora in all women with ASC-US undergoing examination showed normal vaginal condition in 52.7% of patients and in 47.3% bacterial and microscopic images testified the occurrence of inflammation.

Basing on the data obtained it was impossible to exclude or to confirm the impact of bacterial infections of the vagina on the interpretation of the morphology of the cells observed in smears and thus the frequency of the occurrence of atypical cells of undetermined significance.

In the group of women with normal vaginal flora 26.3% were infected with HPV whereas in women with abnormal vaginal flora the result was 29.3%.

The results shown provide no grounds for asserting that bacterial, viral or mixed infection of the vagina is the decisive factor that hinders the interpretation of smears and leads to the cytologist detecting atypical cells of undetermined significance.

Analyzing the results, of the entire research material the following conclusions were made:

1. Diagnosis of ASC-US in cytology in about 8% of cases are associated with the presence of cervical intraepithelial neoplasia. The greatest likelihood of developing

CIN that affects one-third of cases occur in women when the diagnoses of ASC-US are accompanied by HPV infection.

2. Diagnosis of ASC-US with negative test results for HPV does not completely exclude the presence of cervical intraepithelial neoplasia, but the likelihood of this is low.
3. Usefulness of colposcopy in the process of verification of abnormal ASC-US smears is high. The confirmation of suspicious colposcopy images in women with ASC-US is associated with a high probability of development in dysplastic lesions in the cervix and requires a subsequent histopathological verification.
4. The age of women and the condition of vaginal flora do not affect the interpretation of unclear morphology of the cells observed in smears, and thus the frequency of recognition of atypical cells of undetermined significance.
5. The best procedure in the process of verification of abnormal ASC-US smears is associated cytological-colposcopy-viral diagnosis of cervical lesions.