VU VRIJE UNIVERSITEIT AMSTERDAM

VU Research Portal

Triage of HPV-positive women by methylation marker analysis

de Strooper, L.M.A.

2016

document version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Link to publication in VU Research Portal

citation for published version (APA)
de Strooper, L. M. A. (2016). *Triage of HPV-positive women by methylation marker analysis*. [, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

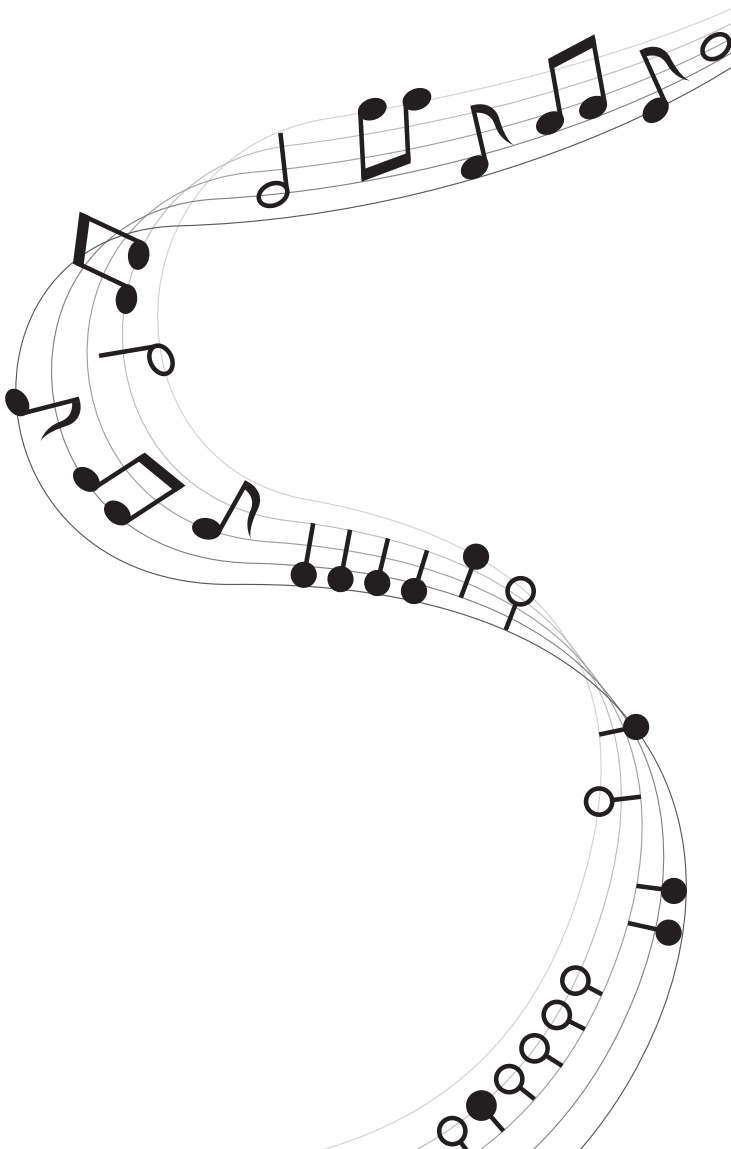
Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:
vuresearchportal.ub@vu.nl

Download date: 09. Oct. 2024

Chapter 9

Summary and Nederlandse Samenvatting



SUMMARY

Cervical cancer is the fourth most common female malignancy worldwide. However, the development of cervical cancer can be prevented by effective screening and prophylactic HPV vaccination. In the Netherlands, a nation-wide cytology-based cervical screening programme for women aged 30-60 years, and prophylactic HPV vaccination for girls aged 12 years (since 2009) are in place. The current Dutch screening programme will be renewed in 2016 by implementation of primary HPV testing and offering self-sampling to non-responders. The efficacy of primary HPV screening has been compared with primary cytology screening in several randomized controlled trials, showing that primary HPV screening has a higher sensitivity for detecting high-grade cervical precursor lesions (CIN2/3) and cervical cancer. Also, HPV testing allows offering self-sampling to increase the screening attendance. It is anticipated that the higher sensitivity of the new screening test together with the attraction of more women into the screening programme will yield additional health gains. However, as most high-risk HPV (hrHPV) infections are transient and will clear spontaneously, triage of hrHPV-positive women is required to detect those women with clinically meaningful lesions thereby preventing over-referral and overtreatment and keeping burden and costs within acceptable limits.

In the new Dutch screening programme, repeat cytology triage (i.e., at baseline and at 6 months in case of normal cytology at baseline) will be implemented. Cytology triage requires repeat testing to gain sufficient protection against high-grade disease and cervical cancer, which has shown to be associated with loss to follow-up. Furthermore, the quality of cytology is, given its subjective nature, rather variable and the fear exists that prior knowledge of hrHPV-positivity in an HPV-based screening setting may lead to more false-positive cytology results and consequently more referrals than expected on forehand. In addition, this triage assay is not reliably applicable to self-samples, requiring these women whenever having an hrHPV-positive self-sample to visit the physician for an additional scrape.

This thesis presents recent work evaluating DNA methylation markers as candidate triage tests for hrHPV-positive women. It elaborates on methylation of the promoter regions of the tumour suppressor genes *CADM1, MAL, mir124-2,* and *FAM19A4,* which provide highly appealing disease markers for hrHPV-positive women. The studies described herein could contribute to a more objective manner of cervical cancer screening, both applicable to physician-taken scrapes and self-collected samples.

Chapter 1 provides a general introduction on the epidemiology, molecular pathogenesis and prevention strategies of cervical cancer.

In **Chapter 2,** we described the step-by-step development of a multiplex quantitative methylation-specific PCR (qMSP) that allows the simultaneous detection of the methylation status of several genes. Most studies investigating DNA methylation analysis as triage test, have suggested that combinations of methylation markers are required to reach an optimal CIN2/3+ sensitivity, and multiplex tools therefore would save time and input material. A multiplex qMSP assay for *CADM1, MAL, mir124-2* and the reference gene ß-actin *(ACTB)* was designed, taken into account primer and probe design and PCR reagents, to allow optimal target amplification. The resulting multiplex qMSP showed similar analytical performance as the singleplex qMSPs on serial dilutions of methylated DNA spiked with unmethylated DNA as well as in cervical scrapes. To conclude, this study indicated that multiplex qMSP offers a promising approach for high-throughput diagnostic analysis of the methylation status of multiple genes, which after proper design and validation can be equally specific, sensitive and reproducible as its singleplex reactions.

In **Chapter 3**, we evaluated the performance of bi-marker *CADM1/MAL* methylation analysis of hrHPV-positive cervical scrapes to that of baseline triage by cytology, and also assessed the combination of both tests for the triage of hrHPV-positive women. Whereas *CADM1/MAL* methylation analysis had equal sensitivity for CIN3+ in hrHPV-positive cervical scrapes as cytology at the same specificity, this study importantly showed that both assays in part detect different lesions. Cytology detected with a similar, moderate sensitivity, cellular abnormalities present in CIN2, CIN3 and cancer, whereas the sensitivity of DNA methylation marker analysis increased with the severity of the disease, resulting in a high sensitivity for CIN3+ lesions, ultimately detecting all carcinomas. Accordingly, a combination of both tests resulted in substantially higher CIN2/3+ sensitivities compared to sole baseline cytology triage at a slight decrease in specificity. The combination of both triage tests could therefore serve as an attractive baseline triage strategy for hrHPV-positive women that without a follow-up scrape reduces the risk of missing cervical cancers and advanced high-grade precursor lesions.

In **Chapter 4**, we further evaluated the clinical performance of multiplex *CADM1/MAL/mir124-2* methylation analysis on large series of cervical scrapes from women with cervical and endometrial cancer. DNA methylation analysis of *CADM1/MAL/mir124-2* detected all scrapes of women with cervical cancer (100%). As such, it was further substantiated that methylation analysis had a high reassurance for the detection of cervical cancer in hrHPV-positive women. In addition, methylation analysis showed the capacity to broaden its use on cervical scrapes through the detection of a substantial subset of endometrial carcinomas (76%). Furthermore, this chapter evaluated *CADM1/MAL/mir124-2* methylation in cervical scrapes of women with CIN3, CIN2 or without evidence of CIN2+, and showed that not only the overall methylation positivity, yet also the number of methylated genes increased proportionally to lesion severity.

In **Chapter 5**, we compared the clinical performance of *FAM19A4* methylation analysis and cytology for triage of hrHPV-positive women on cervical scrapes. Using a training-validation set approach, a *FAM19A4* qMSP was generated that performed with a CIN3+ sensitivity of 75.8% (95% CI: 61.1-90.4) at 67.0% (95% CI: 60.3-73.8) specificity in hrHPV-positive cervical scrapes, equalling cytology triage. Next, the validated assay was evaluated in an independent series of hrHPV-positive cervical scrapes in relation to severity and duration of the underlying lesion. Therefore, scrapes from women with cervical cancer, and women with CIN2/3 with a previous hrHPV infection (PHI) of <5 years or ≥5 years, were used. PHI was used as proxy of lesion duration, and accordingly, CIN2/3 lesions were assigned as early and advanced CIN2/3 lesions, respectively. The validated *FAM19A4* qMSP detected all cervical carcinomas (22/22), while cytology detected 86.4% (19/22). Although *FAM19A4* methylation analysis performed equally well for the overall detection of CIN2/3 lesions as cytology (77% (37/48) versus 75% (36/48)), advanced CIN2/3 lesions were more likely detected by *FAM19A4* methylation (100% (29/29) versus 83% (24/29)), and early CIN2/3 lesions by cytology (42% (8/19) versus 63% (12/19)). This study substantiates our earlier findings that cytology and methylation markers in part detect different lesions. It can be concluded that *FAM19A4* is a very attractive triage marker for hrHPV-positive women with an overall equal performance for CIN3+ detection than cytology, yet with a higher reassurance that no carcinomas or advanced cervical disease are missed among hrHPV-positive women.

In **Chapter 6**, we further compared the clinical performance of the *FAM19A4* qMSP to cytology either or not combined with HPV16/18 genotyping on cervical scrapes for the detection of CIN3+ in hrHPV-positive women. For this purpose, a prospective observational multi-center cohort study among hrHPV-positive women aged 18-66 years, visiting a gynaecologic outpatient clinic was performed. It was found that the performance of *FAM19A4* methylation analysis was significantly influenced by age of the women. In women aged ≥30 years (cervical screening target), methylation analysis by *FAM19A4* showed to be non-inferior to cytology for the identification of CIN3+ lesions, yet revealed higher specificities. Therefore, triage by *FAM19A4* methylation analysis was suggested as attractive alternative for women aged ≥30 years visiting an outpatient clinic. In women aged <30 years, *FAM19A4* methylation analysis resulted in a lower sensitivity and higher specificity for detection of high-grade CIN than cytology. HrHPV prevalence in young women is high, most infections are transient and most lesions regress spontaneously, contributing to a very low cancer incidence in this age group. Our findings may contemplate that *FAM19A4* methylation analysis in young hrHPV-positive women might be more efficient than cytology testing, since only the more advanced lesions are detected. These insights would provide an interesting management strategy for young hrHPV-positive women visiting a gynaecological outpatient clinic, given possible treatment morbidity such as cervical insufficiency, and associated risk for pre-term delivery.

In **Chapter 7**, we assessed the performance of *FAM19A4/mir124-2* methylation analysis for hrHPV-positive women on lavage- and brush-collected self-samples. For this purpose, self-collected samples from hrHPV-positive women participating in the PROHTECT studies (non-responders of cervical screening) were used. Following a training-validation set approach, DNA methylation analysis of *FAM19A4/mir124-2* showed a high and similar detection rate for CIN3+ in both self-samples types. More specifically, a CIN3+ sensitivity of 70.5% (95% CI: 60.4-80.6) at a specificity of 67.8 (95% CI: 62.7-73.0) was obtained in hrHPV-positive lavage self-samples. In the brush self-samples, a sensitivity of 69.4% (95% CI: 58.8-80.1) at a specificity of 76.4% (95% CI: 70.2-82.6) was reached. Accordingly, *FAM19A4/mir124-2* methylation analysis may serve as a universal triage assay for hrHPV-positive self-samples. Nonetheless, part of CIN2 and few of CIN3 lesions is likely to remain undetected when using a methylation marker-based triage strategy. Based on our previous work, these lesions are probably early-onset lesions with a low cancer progression-risk. However, as long as the progression risk of methylation-negative CIN2/3 lesions is unknown, combined molecular triage by methylation marker analysis and HPV16/18 genotyping may be considered for triage of women with an HPV-positive self-sample to increase the sensitivity for early-onset CIN2/3. Indeed, combining *FAM19A4/mir124-2* methylation analysis with HPV16/18 genotyping showed significantly higher sensitivity at lower specificity. Direct molecular triage testing of hrHPV-positive self-samples, independent of the collection device used, can optimize the screening programme, by obviating the need for a cytology triage visit to a physician. This strategy is especially attractive for non-responders of the screening programme.

Finally, in **Chapter 8**, we provided the clinical indications of our findings and possible avenues of future research.

SAMENVATTING

Baarmoederhalskanker is de vierde meest voorkomende kanker bij vrouwen wereldwijd. Deze ziekte wordt gedurende een periode van 10 tot 30 jaar voorafgegaan door niet-invasieve voorloperafwijkingen van de baarmoederhals, die effectief chirurgisch kunnen worden verwijderd. Dit biedt mogelijkheden voor secundaire preventie, namelijk het opsporen van deze afwijkingen in een screeningsprogramma (bevolkingsonderzoek) gevolgd door adequate behandeling, waardoor baarmoederhalskanker kan worden voorkomen. In Nederland worden vrouwen tussen de 30 en 60 jaar iedere 5 jaar uitgenodigd voor deelname aan het bevolkingsonderzoek. Hierbij worden uitstrijkjes van vrouwen beoordeeld op basis van cytologie (Pap test) waarbij afwijkende cellen en voorloperafwijkingen worden opgespoord. Deze voorloperafwijkingen worden ook cervicale intra-epitheliale neoplasieën (CIN) genoemd en kunnen worden onderverdeeld in de laaggradige CIN1 laesies en hooggradige CIN2/3 laesies.

In de laatste decennia is gebleken dat een persisterende infectie met een hoog-risico type van het humaan papillomavirus (hrHPV) noodzakelijk is voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. Uit verschillende grote, gerandomiseerde screeningsstudies is gebleken dat een hrHPV-test een hogere gevoeligheid heeft voor het detecteren van hooggradige voorloperafwijkingen (CIN2/3) van baarmoederhalskanker dan cytologie. Op basis daarvan zal in Nederland in 2016 een nieuw bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker worden ingevoerd, waarbij cytologie als primaire test vervangen zal worden door een hrHPV DNA test. Daarnaast kan, in tegenstelling tot cytologie, de hrHPV-test ook worden uitgevoerd op (cervico-)vaginaal materiaal dat door de vrouw zelf thuis kan worden afgenomen. Dit is drempelverlagend voor vrouwen die in eerste instantie niet zouden deelnemen aan het bevolkingsonderzoek. Daarom zal aan niet-deelneemsters van het nieuwe bevolkingsonderzoek, zelf-afname worden aangeboden voor een hrHPV-test. Verwacht wordt dat een hogere gevoeligheid van de primaire screeningstest, samen met een verhoogde deelnamegraad door middel van zelf-afname, op termijn zal leiden tot een daling in incidentie van en sterfte aan deze ziekte.

Na een hrHPV-infectie is de ophoping van verschillende genetische en epigenetische afwijkingen noodzakelijk voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. Het aantal chromosomale en epigenetische afwijkingen neemt toe met de ernst en duur van de voorloperafwijkingen. Op basis van deze moleculaire, (epi)genetische afwijkingen kunnen bijgevolg gevorderde CIN2/3 afwijkingen met een hoog korte termijn progressie risico op kanker worden onderscheiden van laaggradige, productieve CIN afwijkingen en vroege CIN2/3 afwijkingen met een laag progressie risico.

Omdat de meeste hrHPV-infecties tijdelijk zijn en spontaan verdwijnen, is triage van hrHPV-positieve vrouwen noodzakelijk. Deze triage test moet ervoor zorgen dat alleen de vrouwen met klinisch relevante afwijkingen van de baarmoederhals worden verwezen naar de gynaecoloog voor verder colposcopisch onderzoek. Met deze triage test zal onnodige verwijzing en overbehandeling vermeden worden.

In het nieuwe bevolkingsonderzoek zullen hrHPV-positieve vrouwen getrieerd worden met de cytologie test. Omdat de gevoeligheid van cytologie voor hooggradige voorloperafwijkingen en kanker (CIN2+) echter suboptimaal is, zullen vrouwen met een normaal uitstrijkje na zes maanden opnieuw moeten worden getest. Dit brengt het risico met zich mee dat vrouwen niet terug komen waardoor belangrijke follow-up uitblijft. Daarnaast moeten vrouwen die hrHPV-positief testen op zelf-afgenomen materiaal, een extra bezoek aan de huisarts brengen voor het maken van een uitstrijkje om triage middels cytologie te kunnen uitvoeren. Tot slot, aangezien in het nieuwe bevolkingsonderzoek alleen hrHPV-positieve vrouwen een triage test ondergaan, bestaat de kans dat met voorkennis van hrHPV-aanwezigheid, er sneller een (vals-)positieve cytologie uitslag zal worden afgegeven. Dit zou het aantal vrouwen die onterecht worden verwezen voor colposcopie en vervolgens overbehandeld worden, aanzienlijk kunnen verhogen.

In dit proefschrift wordt de klinische toepasbaarheid van DNA methyleringsanalyse als mogelijke triage test voor hrHPV-positieve vrouwen beschreven. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat methylering van de promoter regio's van de tumor suppressor genen *CADM1, MAL, mir124-2,* en *FAM19A4* sterk geassocieerd is met het ontstaan van baarmoederhalskanker. Daarom hebben we de waarde van methyleringsanalyse van deze genen voor triage van hrHPV-positieve vrouwen verder bestudeerd. We hebben ons hierbij niet alleen gericht op uitstrijkjes, maar ook op zelf-afgenomen (cervico-)vaginaal materiaal. Daarnaast is gekeken of een methyleringstriage test ook gecombineerd zou kunnen worden met een andere test. Tot slot hebben we de relatie tussen methylering en zowel de ernst als de duur van voorloperafwijkingen van de baarmoederhals in kaart gebracht.

In **Hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie gegeven over de epidemiologie van baarmoederhalskanker, de moleculaire veranderingen die optreden bij de ontwikkeling ervan en de huidige en toekomstige strategieën voor baarmoederhalskankerpreventie.

In **Hoofdstuk 2** wordt stapsgewijs de ontwikkeling van een multiplex, kwantitatieve methylering-specifieke PCR (qMSP) beschreven, die de methyleringsstatus van verschillende genen evalueert in één enkele reactie. In de meeste studies die het gebruik van DNA methyleringsanalyse voor CIN3+ detectie hebben onderzocht, bleek het combineren van testen voor verschillende genen noodzakelijk om een optimale gevoeligheid voor CIN3+ te bereiken. Echter, het evalueren van de methyleringsstatus van verschillende genen in individuele (zogenaamde singleplex) testen is tijdrovend en vereist veel klinisch materiaal. Daarom werd een multiplex qMSP test ontwikkeld waarin de methyleringsstatus van

CADM1, MAL, en *mir124-2* genen samen met een interne controle, ß-actin *(ACTB)*, in één test kan worden bepaald. Zowel op verdunningsreeksen van reconstructies als op uitstrijkjes, bleek er een goede correlatie te bestaan tussen de uitkomst van deze multiplex qMSP en de singleplex qMSPs voor deze genen. Deze test heeft dezelfde gevoeligheid, specificiteit en reproduceerbaarheid als de individuele qMSP testen. Bijgevolg is multiplex qMSP een veelbelovende techniek om methylering van meerdere genen in één reactie te bepalen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de waarde van methyleringsanalyse van twee markers, *CADM1* en *MAL*, in vergelijking met cytologie op hrHPV-positieve uitstrijkjes. Daarnaast is de combinatie van methylering en cytologie geëvalueerd. *CADM1/MAL* methyleringsanalyse leverde dezelfde klinische gevoeligheid en specificiteit voor CIN3+ afwijkingen als cytologie. Opvallend was dat de methylering en cytologie testen niet exact dezelfde afwijkingen detecteren. Cytologie bleek relatief effectief in het detecteren van vroege, CIN2 afwijkingen en liet voor CIN3 en baarmoederhalskanker een kleine stijging in gevoeligheid zien. De gevoeligheid van de bi-marker *CADM1/MAL* methyleringstest was daarentegen aanmerkelijk lager voor CIN2, maar liet een sterk stijging zien met de ernst van de ziektegraad, en detecteerde 100% van de baarmoederhalskankers. Dit had als gevolg dat een combinatie van beide testen een aanmerkelijk hogere gevoeligheid voor ernstige afwijkingen liet zien dan cytologie alleen, ten koste van een kleine daling in specificiteit. De combinatie van cytologie en *CADM1/MAL* methyleringsanalyse kan daarom worden gezien als een interessant triage alternatief voor hrHPV-positieve vrouwen, waarbij zonder herhaaltest na zes maanden, het risico op het missen van baarmoederhalskanker en ernstige voorloperafwijkingen zeer klein is.

In **Hoofdstuk 4** analyseerden we de klinische waarde van methyleringsanalyse met een gestandaardiseerde *CADM1/MAL/mir124-2* multiplex qMSP test in een grote serie uitstrijkjes van vrouwen met baarmoederhalskanker en kanker van het baarmoederslijmvlies. We vonden dat met deze multiplex methyleringsanalyse alle (100%) uitstrijkjes van vrouwen met baarmoederhalskanker positief waren. Daarnaast bleek ook de meerderheid (76%) van de vrouwen met kanker van het baarmoederslijmvlies een methyleringspositief uitstrijkje te hebben. Bovendien toonde de analyse van uitstrijkjes van vrouwen zonder afwijkingen en vrouwen met premaligne aandoeningen (CIN2, CIN3) aan dat zowel het percentage aan methyleringspositieve testuitslagen als het aantal gemethyleerde genen toeneemt met de ernst van de ziekte.

In **Hoofdstuk 5** vergeleken we de klinische waarde van een nieuwe methyleringsmarker, namelijk *FAM19A4*, met cytologie voor de triage van vrouwen met een hrHPV-positief uitstrijkje. We vonden dat de *FAM19A4* methyleringstest een klinische gevoeligheid voor CIN3+ had van 75.8% (95% CI: 61.1-90.4) bij een klinische specificiteit van 67.0% (95% CI: 60.3-73.8) onder hrHPV-positieve vrouwen, wat vergelijkbaar was met de performance van cytologie triage. Daarnaast onderzochten we de waarde van de *FAM19A4* qMSP test voor het detecteren van baarmoederhalskanker en hooggradige voorloperafwijkingen (CIN2/3) waarvan bekend was hoe lang de HPV-infectie reeds aanwezig was. Er werd aangenomen

dat de duur van de HPV-infectie gerelateerd is aan de duur van het bestaan van de afwijking. Hierbij maakten we een onderscheid tussen zogenaamde vroege CIN2/3 afwijkingen (met een voorafgaande HPV-infectie van minder dan 5 jaar) en meer gevorderde CIN2/3 afwijkingen (met een voorafgaande HPV-infectie van 5 jaar of langer). We vonden dat *FAM19A4* methyleringsanalyse een positieve uitslag gaf bij alle carcinomen (22/22), terwijl cytologie een paar carcinomen miste (19/22 waren positief met cytologie). Daarnaast werden de gevorderde CIN2/3 afwijkingen beter gedetecteerd door *FAM19A4* methyleringsanalyse (100% (29/29)) dan cytologie (83% (24/29)), terwijl de vroege CIN2/3 afwijkingen beter werden gedetecteerd door cytologie (42% (8/19) versus 63% (12/19), respectievelijk). Methyleringsanalyse met de *FAM19A4* qMSP is dus een waardevolle triage test die beter carcinomen en gevorderde CIN2/3 afwijkingen detecteert dan cytologie.

In **Hoofdstuk 6** werden verschillende triage strategieën getest bij hrHPV-positieve vrouwen (leeftijd 18-66 jaar) uit een gynaecologische polikliniek die deelnamen aan een prospectieve cohort studie. Alle vrouwen ondergingen een *FAM19A4* methyleringstest en cytologie. We lieten zien dat de klinische performance van de methyleringstest significant werd beïnvloed door de leeftijd van de vrouwen. In vrouwen ouder dan 30 jaar werd aangetoond dat methyleringsanalyse van *FAM19A4* analyse even gevoelig is als cytologie voor de detectie van CIN3+ afwijkingen, met daarbij een aanmerkelijk hogere specificiteit. In vrouwen jonger dan 30 jaar was de klinische specificiteit van *FAM19A4* ook hoger dan die van cytologie, maar hier was de gevoeligheid van *FAM19A4* voor de detectie van CIN2/3+ aanzienlijk lager. Dit kan samenhangen met het feit dat jonge vrouwen vaak hrHPV-infecties hebben van voorbijgaande aard en voorloperafwijkingen die vaak spontaan verdwijnen. Op basis van de aanmerkelijk hogere specificiteit, zou *FAM19A4* methyleringsanalyse kunnen worden overwogen om overbehandeling van vroege afwijkingen te voorkomen. Hiermee zou de kans op ernstige bijwerkingen zoals een verhoogd risico op vroeggeboorte en vruchtbaarheidsproblemen kunnen teruggedrongen worden bij vrouwen met een kinderwens.

In **Hoofdstuk 7** evalueerden we de klinische waarde van *FAM19A4/mir124-2* methyleringsanalyse op hrHPV-positief zelf-afgenomen materiaal. We evalueerden materiaal dat was verzameld door voormalige niet-deelneemsters van het bevolkingsonderzoek, waarbij zelf-afname is aangeboden in voormalige PROHTECT studies. Twee typen zelf-afgenomen materiaal zijn onderzocht: 1. vloeistof verkregen na een vaginale spoeling en 2. slijmvlies van de vaginawand verzameld met een borsteltje. We vonden dat methyleringsanalyse met *FAM19A4/mir124-2* dezelfde doeltreffendheid heeft in beide thuistest types. De klinische gevoeligheid voor opsporen van CIN3+ in vaginale spoelingen was 75.0% (95% CI: 61.6-88.4) bij een specificiteit van 68.8% (95% CI: 63.2-74.3). Voor de thuistesten verzameld met een borsteltje, waren deze percentages respectievelijk 72.1% (95% CI: 60.9-83.4) en 67.5% (95% CI: 62.1-72.9). Het combineren met HPV16/18 genotypering leverde nog een sensitiviteitsverhoging van ongeveer 15%. Uit ons onderzoek konden we opmaken dat de methyleringsanalyse met *FAM19A4/mir124-2*, al dan niet in combinatie met HPV16/18

genotypering, een universele marker is voor de triage van hrHPV-positief zelf-afgenomen materiaal. Directe moleculaire triage op deze materialen kan bijdragen tot een effectieve screening van vrouwen die geen bezoek aan de huisarts willen of kunnen brengen voor het maken van een uitstrijkje van de baarmoederhals.

In **Hoofdstuk 8** beschrijven we een algemene discussie van de studieresultaten en de voor- en nadelen van de huidige en alternatieve triage testen voor hrHPV-positieve vrouwen. Tot slot worden ook toekomstperspectieven voor screening besproken.

Samenvattend kunnen we stellen dat de studies die beschreven zijn in dit proefschrift, hebben geleid tot nieuwe inzichten in alternatieve triage strategiën voor hrHPV-positieve vrouwen. Triage van vrouwen met een hrHPV-positief uitstrijkje door middel van *CADM1/MAL* of *FAM19A4* methyleringsanalyse, bleek even gevoelig te zijn dan cytologie voor de detectie van CIN3+ afwijkingen. Bovendien detecteert methyleringsanalyse met name de meest gevorderde laesies en alle kankers, wat een groot voordeel is ten opzichte van cytologie triage. Daarnaast bleek *FAM19A4/mir124-2* methyleringsanalyse, even gevoelig te zijn in zelf-afgenomen materiaal verzameld met een vaginale spoeling als met een borsteltje. Deze moleculaire test die direct kan worden toegepast op het zelf-afgenomen materiaal, zal hiermee de diagnostiek van hrHPV-positieve vrouwen aanzienlijk kunnen versnellen. Hoewel methyleringsanalyse de meest ernstige voorloperafwijkingen en kankers opspoort, worden een deel van de CIN2 een aantal CIN3 afwijkingen niet gedetecteerd. Dit zijn waarschijnlijk de minder ernstige laesies met een lager risico op progressie tot kanker. Voor clinici die ook vroege of incidente CIN2/3 laesies met een laag progressie risico op kanker willen detecteren, kan de gevoeligheid voor CIN3+ van triage aanzienlijk worden verhoogd door het combineren van methyleringsanalyse met cytologie (in het geval van uitstrijkjes) of HPV16/18 genotypering (in het geval van zowel uitstrijkjes als zelf-afgenomen monsters). Dit gaat echter ten koste van specificiteitsverlies en bijgevolg meer verwijzingen naar de gynaecoloog.