

## **Chapter 9**

Nederlandse samenvatting

Wetenschappelijk onderzoek heeft uitgewezen dat baarmoederhalskanker wordt veroorzaakt door een infectie met een virus, het zogenaamde hoog-risico humaan papillomavirus (hrHPV). Bij aanhoudende (d.w.z. persisterende) infectie van het slijmvliesepitheel van de baarmoederhals met hrHPV, kan baarmoederhalskanker ontstaan. Dit proces verloopt via een aantal premaligne voorstadia, de zogeheten cervicale intraepitheliale neoplasie (CIN) afwijkingen, gegradeerd van 1 tot 3. Door vroegtijdige ontdekking (d.w.z. het opsporen van deze voorloperafwijkingen die goed (lokaal) te behandelen zijn) is het ontstaan van baarmoederhalskanker te voorkomen. Het huidige bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker, dat gebruik maakt van de cytologische beoordeling van uitstrijkjes van de baarmoederhals op de aanwezigheid van afwijkende cellen kenmerkend voor deze CIN afwijkingen en baarmoederhalskanker, is hierop gebaseerd.

De ontdekking dat hrHPV de veroorzaker is van baarmoederhalskanker heeft geresulteerd in twee nieuwe mogelijkheden voor de preventie van baarmoederhalskanker; (1) primaire preventie door profylactisch vaccineren tegen hrHPV (nl. de typen 16 en 18, die samen verantwoordelijk voor 70% van alle tumoren); en (2) secundaire preventie door vrouwen te testen op de aanwezigheid van hrHPV in het uitstrijkje, in plaats van of naast cytologie. In dit proefschrift wordt dieper ingegaan op punt 2.

In grote (inter)nationale bevolkingsonderzoek studies is recent aangetoond dat testen op de aanwezigheid van hrHPV de gevoeligheid voor het opsporen van baarmoederhalskanker en ernstige CIN afwijkingen (afgekort als

$\geq$ CIN2) aanzienlijk verbeterd ten opzichte van de huidige cytologische methode. Dit betekent dat de effectiviteit en doelmatigheid van het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker enorm kan verbeteren door het invoeren van hrHPV testen, zoals ook blijkt uit een in Nederland uitgevoerd bevolkingsonderzoek studie (POBASCAM genaamd). Door de HPV test in te voeren zouden vrouwen maar eens per 6 tot 8 jaar hoeven te worden gescreend, tegenover eens per 5 jaar zoals dat nu het geval is.

Echter, men moet zich realiseren dat niet elke hrHPV infectie resulteert in  $\geq$ CIN2. Naar schatting maakt meer dan 80% van de seksueel actieve bevolking ooit een hrHPV infectie mee in zijn leven, terwijl maar een klein deel van alle hrHPV infecties van de baarmoederhals tot  $\geq$ CIN2 leidt. Dit geeft aan dat het merendeel van de hrHPV infecties spontaan verdwijnt en slechts een minderheid zal persisteren en tot een ernstige afwijking leiden. De hrHPV test moet bij voorkeur alle vrouwen met  $\geq$ CIN2 of risico op  $\geq$ CIN2 identificeren, maar zo min mogelijk vrouwen met een tijdelijke hrHPV infectie. Met andere woorden, het is belangrijk dat de hrHPV test klinisch relevantie infecties aantoon, d.w.z. de infecties die leiden tot ernstige afwijkingen. Immers, test-positieve vrouwen zullen klinisch vervolgd moeten worden, hetgeen een onnodige extra kostenpost en ongerustheid bij de vrouw teweeg brengt indien dit tijdelijke hrHPV infecties betreft. Het is daarom van belang dat, voordat een hrHPV test wordt geïmplementeerd in het nationale bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker, een optimale balans tussen klinische gevoeligheid (ofwel het percentage aan vrouwen met ernstige afwijkingen die test positief zijn)

en specificiteit (ofwel het percentage aan vrouwen zonder afwijkingen die test negatief zijn) voor  $\geq$ CIN2 wordt verkregen. Alleen in dat geval kunnen vrouwen met ernstige baarmoederhalsafwijkingen efficiënt worden geïdentificeerd en het aantal overbodige herhaaladviezen en verwijzingen naar de gynaecoloog worden geminimaliseerd. Dit proefschrift behandelt hoe het verband is tussen deze klinische aspecten HPV DNA test karakteristieken. Uit de bevindingen volgt een voorstel voor richtlijnen waaraan een hrHPV DNA test ten behoeve van het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker dient te voldoen.

In het eerste gedeelte van dit proefschrift (**Hoofdstukken 2-4**) onderzochten we welke van de meest gebruikte hrHPV DNA testen de beste balans laten zien tussen de klinische gevoeligheid en specificiteit voor  $\geq$ CIN2.

Uit **Hoofdstuk 2** blijkt dat een commercieel verkrijgbare DNA in situ hybridisatie (afgekort als ISH) test, in vergelijking met de hybrid capture 2 (afgekort als hc2) test, een te lage gevoeligheid heeft om  $\geq$ CIN2 te detecteren. Alleen uitstrijkjes die een relatief hoge hoeveelheid virus kopieën (ook wel virale load genoemd) hadden, waren positief met de ISH test. Dit werd afgeleid uit de hc2 uitslag zoals uitgedrukt in RLU/CO waarden. Samenvattend, heeft de ISH een te lage gevoeligheid voor  $\geq$ CIN2 om als screening middel binnen het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker te worden gebruikt.

In **Hoofdstuk 3** worden vervolgens de geautomatiseerde hc2 en de GP5+/6+-PCR assays met elkaar vergeleken in een cross-sectionele studie op uitstrijkjes van

vrouwen die deelnamen aan het prospectieve, gerandomiseerde bevolkingsonderzoek POBASCAM. Beide testen hadden een vergelijkbaar hoge gevoeligheid voor  $\geq$ CIN2. Echter, de klinische specificiteit voor  $\geq$ CIN2 van hc2 was significant lager dan die van de GP5+/6+-PCR, doordat de hc2 meer uitstrijkjes positief scoorde van vrouwen die geen ernstige afwijking van de baarmoederhals hadden. Een belangrijke bevinding was dat we de klinische specificiteit van de hc2 enorm konden verbeteren door het afkappunt voor positiviteit te verhogen (van 1 naar 2 RLU/CO) zonder dat dit ten koste ging van de klinische sensitiviteit. Bij een nog hoger afkappunt (3 RLU/CO) verschilden beide testen niet meer van elkaar qua klinische gevoeligheid en specificiteit. Hieruit konden we concluderen dat beide testen even accuraat zijn in de detectie van  $\geq$ CIN2, mits het afkappunt van de hc2 test iets wordt verhoogd.

In **Hoofdstuk 4** vergelijken we in een case-control studie de GP5+/6+-PCR met de SPF<sub>10</sub> HPV DNA test voor het opsporen van  $\geq$ CIN2 in vrouwen met normale cytologie. Het is bekend dat de SPF<sub>10</sub> HPV DNA test zeer gevoelig is voor het meten van hrHPV infecties. De toepassing van de SPF<sub>10</sub> resulteerde niet in betere klinische sensitiviteit voor  $\geq$ CIN2, maar wel tot een significant lagere klinische specificiteit ten opzichte van de GP5+/6+-PCR. De extra positiviteit aangetoond met de SPF<sub>10</sub> betrof met name infecties met een hele lage virale load die geen  $\geq$ CIN2 veroorzaakten.

Samenvattend, de **Hoofdstukken 2-4** hebben aangetoond dat de analytische gevoeligheid van de ISH test te laag en die van de SPF<sub>10</sub> test te hoog is om te worden gebruikt in het bevolkingsonderzoek

naar baarmoederhalskanker. De klinische waarde van de GP5+/6+-PCR en hc2 testen was nagenoeg gelijk, wat in overeenstemming is met resultaten uit grote bevolkingsonderzoekstudies (1-3). Echter, de klinische specificiteit van deze twee testen is nog steeds voor verbetering vatbaar aangezien ook nog hrHPV infecties worden gemeten die uiteindelijk toch niet leiden tot ernstige afwijkingen van de baarmoederhals. Om te achterhalen of deze specificiteit kan worden verhoogd, hebben we in het tweede gedeelte van dit proefschrift de toegevoegde waarde van virale load bepalingen geëvalueerd in vrouwen met een positief GP5+/6+-PCR testresultaat.

Hiertoe hebben we allereerst real-time (d.w.z. 'meten in de tijd') PCR testen ontwikkeld en gevalideerd die het mogelijk maken om de hoeveelheid HPV16, -18, -31, en -33 DNA en DNA van het  $\beta$ -globine gen in uitstrijkjes kunnen bepalen (**Hoofdstuk 5**). Met deze testen konden we van een uitstrijkje het aantal HPV kopieën per cel bepalen.

In **Hoofdstuk 6** zijn in een cross-sectionele studie met behulp van deze real-time PCR methoden virale load afkappunten bepaald voor HPV16, -18, -31 en -33 waarboven alle vrouwen met afwijkende cytologie, die een  $\geq$ CIN3 hadden, konden worden aangetoond. Deze afkappunten waren gebaseerd op het 33<sup>ste</sup> percentiel van de virale load waarden gevonden in hrHPV positieve vrouwen met normale cytologie die deelnamen aan de POBASCAM studie. Op deze manier is het mogelijk om bij maximaal 33% van de vrouwen aanwezigheid van  $\geq$ CIN3 uit te sluiten met behulp van virale load bepalingen. Verder was het opvallend dat de absolute virale load waarden corresponderend met het 33<sup>ste</sup> percentiele afkappunt tussen de

vier HPV typen enorm verschilden.

Tot slot hebben we in **Hoofdstuk 7** de in **Hoofdstuk 6** gedefinieerde virale load afkappunten in een prospectief, gerandomiseerd bevolkingsonderzoek (POBASCAM) geëvalueerd, gebruikmakende van 18-maands klinische vervolgegegevens. Ondanks het feit dat voor de meeste onderzochte HPV typen een verhoogde virale load een verhoogd risico op  $\geq$ CIN2 liet zien, kon het gebruik van een afkappunt geen  $\geq$ CIN2 uitsluiten in een tijdsbestek van 18 maanden. Dit kon vooral verklaard worden door de grote overlap tussen virale load waarden in vrouwen met en zonder  $\geq$ CIN2. Hieruit kan worden geconcludeerd dat virale load analyse niet gebruikt kan worden om de klinische specificiteit van de GP5+/6+-PCR te verbeteren. Aangezien de cytologie een betere voorspellende waarde bleek te hebben dan virale load in de groep van vrouwen die positief waren voor hrHPV met de GP5+/6+-PCR test, heeft virale load analyse ook geen meerwaarde ten opzichte van de cytologie om GP5+/6+-PCR positieve vrouwen te selecteren die een verwijzing behoeven naar de gynaecoloog voor colposcopisch onderzoek.

Samenvattend, hebben de studies verricht in dit proefschrift geresulteerd in meer inzicht in de klinische test karakteristieken van de verschillende hrHPV DNA testen. Van de geanalyseerde HPV testen zijn de GP5+/6+-PCR en de hc2 test het meest geschikt voor toepassing binnen het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker. Dit wordt ook ondersteund door de gevonden klinische relevantie van deze twee HPV testen in grote bevolkingsonderzoek studies (1-3). Derhalve kunnen deze twee HPV testen

worden beschouwd als klinisch gevalideerd. De studies uitgevoerd binnen dit proefschrift hebben verder bewezen dat HPV testen aan strikte richtlijnen moeten voldoen voor een kosteneffectieve toepassing binnen het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker. De verschillende onderzochte testen verschillen voornamelijk in klinische specificiteit, hetgeen voor het grootste gedeelte kan worden toegewezen aan het verschil in detectie van HPV infecties, welke niet tot ernstige premaligne afwijkingen leiden (d.w.z. tijdelijke infecties, gekarakteriseerd door lage virale load waarden). Deze infecties zijn niet klinisch relevant, en detectie van deze infecties binnen een bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker moet zo veel mogelijk worden voorkomen om onnodige herhaalonderzoeken en onrust bij vrouwen te vermijden. Daarom is het van belang dat ten behoeve van screening HPV testen voldoen aan bepaalde richtlijnen. Deze richtlijnen zijn opgesteld in **Hoofdstuk 8**. Het betreft klinische gevoeligheids- en specificiteit eisen, eisen met betrekking tot intra- en interlaboratorium overeenkomsten, en eisen waaraan een laboratorium die de HPV test binnen het bevolkingsonderzoek uitvoert, moet voldoen. Met het positioneren van deze richtlijnen beogen wij een hoge klinische sensitiviteit en specificiteit binnen het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker te waarborgen. Het is te verwachten dat (inter)nationale overeenstemming over deze richtlijnen de implementatie van hrHPV testen binnen de bevolkingsonderzoeken naar baarmoederhalskanker zal versnellen.

#### Referentie lijst

1. Bulkman N, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade F, Boeke A, 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.
2. Naucler P, Ryd W, Tornberg S, Strand A, Wadell G, Elfgrén K et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N.Engl.J.Med.* 2007;357(16):1589-97.
3. 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;357(16):1579-88.