



УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
ВО СКОПЈЕ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ ВО
СКОПЈЕ



Даниел Милковски

**Примена на p16 и Ki67 двојно цитолошко
боење кај преканцерозни лезии и
цервикален карцином**

Докторски труд

Скопје, 2026



„SS. CYRIL AND METHODIUS” UNIVERSITY
IN SKOPJE

FACULTY OF MEDICINE



Daniel Milkovski

**Application of p16 and Ki-67 Dual
Cytological Staining in Precancerous Lesions
and Cervical Carcinoma**

Doctoral Dissertation

Skopje, 2026

Ментор:

Проф. д-р ВЕСНА ЈАНЕВСКА

Комисија за одбрана:

Проф. д-р МАРЈАН СТОЈОВСКИ (претседател)

Проф. д-р ВЕСНА ЈАНЕВСКА (ментор)

Проф д-р ВИКТОРИЈА ЈОВАНОВСКА (член)

Проф. д-р ИГОР АЛУЛОСКИ (член)

Проф. д-р СЛАВИЦА КОСТАДИНОВА КУНОВСКА (член)

....на мајка ми и татко ми....

СОДРЖИНА

<i>АПСТРАКТ</i>	5
<i>ABSTRACT</i>	7
Епидемиолошки податоци за цервикален карцином	9
Хистолошки типови на инвазивен карцином на грлото на матката	15
Стадиуми на Цервикален карцином:	18
Менаџментот на карциномот на грлото на матката главно вклучува:	18
<i>ПРЕВЕНЦИЈА НА ЦЕРВИКАЛЕН КАРЦИНОМ</i>	20
Примарна превенција HPV вакцинација.....	20
Секундарна превенција / Скрининг	22
<i>P16/KI67 ДВОЈНО БОЕЊЕ (DUAL STAINING) ИМУНОЦИТОХЕМИЈА</i>	30
Тријажа на HPV позитивни пациентки.....	35
Тријажа на пациентки со LSIL/ASCUS цитологија	36
Мониторирање на повторувачки лезии	37
<i>МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДОКТОРСКАТА СТУДИЈА</i>	39
<i>ЦЕЛИ</i>	41
<i>ХИПОТЕЗА</i>	41
<i>МАТРИЈАЛ И МЕТОДИ</i>	42
<i>МЕТОДИ:</i>	44
<i>СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА ПОДАТОЦИ</i>	47
<i>РЕЗУЛТАТИ</i>	48
<i>ДИСКУСИЈА</i>	95
<i>ОГРАНИЧУВАЊЕ НА СТУДИЈАТА</i>	120
<i>ИДНИ ПЕРСПЕКТИВИ</i>	121
<i>РЕФЕРЕНТНА ЛИТЕРАТУРА</i>	122

ПРИМЕНА НА p16 И Ki67 ДВОЈНО ЦИТОЛОШКО БОЕЊЕ КАЈ ПРЕКАНЦЕРОЗНИ ЛЕЗИИ И ЦЕРВИКАЛЕН КАРЦИНОМ

Даниел Милковски

АПСТРАКТ

Вовед: Цервикалниот карцином е четврт малиген тумор кај жените во светот и претставува глобален јавно здравствен проблем. Докажаната ефикасност на вакцинацијата против најонкогените хуман папилома вируси и скринингот, прави карциномот на грлото на матката да биде превентивен. Во моментот цитологија, HPV тестирањето и цитологија комбинирана со HPV тестирање се методи за скрининг на пациентки за цервикален карцином. Поради инсуфициентност на овие скрининг методи за детекција на лезии од висок градус потребен е дополнителен маркер за тријажа кој ќе идентификува CIN2+ лезии. p16/Ki67 двојното боење претставува биомаркер со висока сензитивност и специфичност за CIN2+ лезии. Воведувањето на таков биомаркер во тријажа и идентификација на цервикални лезии од висок градус кај пациентките според прелиминарните резултати од скринингот е неопходен за да спречи преголем број упатувања на пациентките на колпоскопија и биопсија.

Материјал и методи: Дизајнот на студијата е пресечна студија на кохорта, направена на Универзитетската Клиника за Гинекологија и Акушерство, Скопје во период од 2024-2025 година. Кај сите пациентки е направено тестирање за HPV DNA со типизирање, цитолошко тестирање (LB), p16/Ki67 двојното цитолошко боење како и биопсија за хистолошка верификација. Направена е корелација на наодите помеѓу групите со хистолошкиот наод со цел детектирање на лезии од висок градус. Податоците се колекционирани со стандарден прашалник кој вклучува анамнеза со демографски податоци и гинеколошка податоци од медицинската документација. Анализирани се сензитивноста и специфичноста, PPV и NPP на p16/Ki67 двојното цитолошко боење како тријажен тест во однос на цитологијата, HPV тестот и хистолошкиот наод од биопсија за лезии од висок градус (CIN2+).

Резултати: Во испитувањето беа вклучени 145 пациентки. LBC цитологијата е слаб предиктор за присуство на CIN2+, со AUC од 0.527 (95% CI 0.420–0.634), што укажува дека самостојното цитолошко испитување има ограничена способност. Анализата на присуство на HPV по типови покажа дека најсилен предиктор за CIN2+ е истовремено присуство на HPV 16/18, со AUC од 0.732 (95% CI 0.634–0.831). Присуство само на HPV 16 имаше умерена предиктивна вредност, со AUC од 0.673 (95% CI 0.568–0.779), додека HPV 18 и 31 покажаа слаба предиктивна моќ со AUC од 0.578 (95% CI 0.469–0.687) и 0.569 (95% CI 0.461–0.676), соодветно. HPV типовите, како HPV 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58 и 59, имаа значително пониска предиктивна вредност, со AUC вредности помеѓу 0.411 и 0.491. Најдобра предикција за присуство на CIN2+ има имуноцитохемиското двојно боење p16/Ki-67, кое има AUC од 0.759 (95% CI 0.66–0.857). Комбинираните тестови за предикција на CIN2+ лезии како што се Цитологија + HPV + p16/Ki-67 → AUC = 0.870, HPV + p16/Ki-67 → AUC = 0.843, Цитологија + p16/Ki-67 → AUC = 0.791, имаат подобра дискриминаторска моќ соодветно. LBC цитологијата покажува умерена специфичност (83.33%) но релативно ниска сензитивност (50.00%) во детекција на >CIN2+ лезии, што укажува на ограничена способност за препознавање на сите вистински позитивни случаи. HPV 16/18 генотипизацијата демонстрира подобра сензитивност (60.98%) и висока специфичност (85.44%), со солидни PPV и NPV вредности, што ја прави посигурен предиктор во однос на цитологијата. Највисока дијагностичка точност покажува p16/Ki-67 Dual-Staining, со најголема специфичност (93.2%) и највисока позитивна предиктивна вредност (77.4%), што го издвојува како најпрецизен метод за идентификација на високоризични >CIN2+ лезии.

Заклучок: Студијата покажа дека p16/Ki-67 Dual-Staining е корисен тријажен тест за разграничување на пациентките со нискоризични и високоризични лезии на грлото на матката поради неговата висока сензитивност и специфичност и дека неговата применливост во почетокот во дијагностичките алгоритми е значајна за намалување на бројот на непотребни упатувања на колпоскопија и биопсија

Клучни зборови: p16/Ki67, имуноцитохемија, сензитивност, специфичност, PPV, NPV HPV, цитологија.

APPLICATION OF p16 and Ki-67 DUAL CYTOLOGICAL STAINING IN PRECANCEROUS LESIONS AND CERVICAL CARCINOMA

Daniel Milkovski

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is the fourth most common malignant tumor among women worldwide and represents a global public health problem. The proven effectiveness of vaccination against the most oncogenic human papillomavirus (HPV) types and the implementation of screening programs make cervical cancer a preventable disease. Currently, cytology, HPV testing, and cytology combined with HPV testing are used as screening methods for cervical cancer. Due to certain limitations of these methods, an additional triage marker is needed to identify high-grade cervical lesions. p16/Ki-67 dual staining is a biomarker with high sensitivity and specificity for CIN2+ lesions. The introduction of such a biomarker for triage and identification of high-grade cervical lesions, according to preliminary screening results, is necessary in order to prevent unnecessary referrals for colposcopy and biopsy.

Materials and Methods: This was a cross-sectional cohort study conducted at the University Clinic of Gynecology and Obstetrics in Skopje during the period 2024–2025. All patients underwent HPV DNA testing with genotyping, cytological testing (liquid-based cytology, LBC), p16/Ki-67 dual immunocytochemical staining, and biopsy for histological verification. Correlation of findings between the test groups and histological results for detection of high-grade lesions was performed. Patient data were collected using a standardized questionnaire that included medical history, demographic data, and gynecological information from medical records, with informed consent obtained. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of p16/Ki-67 dual staining as an additional triage test were analyzed in relation to cytology, HPV testing and biopsy for the detection of high-grade lesions (CIN2+).

Results: A total of 145 patients were included in the study. LBC cytology is a weak predictor of CIN2+ lesions, with an AUC of 0.527 (95% CI 0.420–0.634), indicating limited diagnostic performance when used alone. Analysis of HPV genotype presence

showed that concurrent HPV 16/18 infection was the strongest predictor of CIN2+, with an AUC of 0.732 (95% CI 0.634–0.831). HPV 16 alone had moderate predictive value (AUC 0.673; 95% CI 0.568–0.779), while HPV 18 and HPV 31 demonstrated weak predictive power (AUC 0.578 and 0.569, respectively). Other HPV types (33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, and 59) had significantly lower predictive values (AUC 0.411–0.491). The best prediction of CIN2+ was achieved with p16/Ki-67 dual immunocytochemical staining, with an AUC of 0.759 (95% CI 0.66–0.857). Combined testing improved discriminative power: Cytology + HPV + p16/Ki-67 → AUC = 0.870, HPV + p16/Ki-67 → AUC = 0.843, Cytology + p16/Ki-67 → AUC = 0.791. LBC cytology showed moderate specificity (83.33%) but relatively low sensitivity (50.00%) for detecting >CIN2+ lesions, indicating limited ability to identify all true positive cases. HPV 16/18 genotyping demonstrated better sensitivity (60.98%) and high specificity (85.44%), with solid PPV and NPV, making it a more reliable predictor than cytology alone. The highest diagnostic accuracy was achieved with p16/Ki-67 dual staining, which showed the greatest specificity (93.2%) and the highest positive predictive value (77.4%), distinguishing it as the most precise method for identifying high-risk >CIN2+ lesions.

Conclusion: The study demonstrated that p16/Ki-67 dual staining is a useful triage test for distinguishing between low-risk and high-risk cervical lesions due to its high sensitivity and specificity. Its incorporation at an early stage in diagnostic algorithms is important for reducing the number of unnecessary referrals for colposcopy and biopsy.

Keywords: p16/Ki-67, immunocytochemistry, sensitivity, specificity, PPV, NPV, HPV, cytology.

ВОВЕД

Епидемиолошки податоци за цервикален карцином

Цервикалниот карцином спаѓа во групата на почестите малигни заболувања кај жените во светот и се наоѓа на четврто место по карциномот на дојка, колоректалниот и карциномот на бели дробови [1]. Малигномот на грлото на матката е глобален јавно здравствен проблем, особено во многу земји со низок и среден степен на развој [2]. Според GLOBOCAN во 2022 година во светот од цервикален карцином заболеле 662 044 пациентки а починати се 348 709, со инциденца 14,1 и морталитет 7,1 на 100 000. Поголемиот дел од новодијагностицираните и смртните случаи приближно 85% и 90%, соодветно се јавуваат во земјите со низок и среден степен на развој (LMIC), каде што е трет најчест карцином кај жените [3].

Највисоката стапка на инциденца и морталитет се во Субсахарска Африка, Централна Америка и Југоисточна Азија. Овие регионални разлики се одразуваат од нееднаквоста во пристапот до вакцинација, скрининг и лекување. Дополнително, тие се под влијание на фактори на ризик како што се преваленцата на HIV и од пошироки социјални и економски детерминанти, вклучувајќи ја родовата нееднаквост и сиромаштијата. Жените кои живеат со HIV имаат шест пати поголема веројатност да добијат карцином на грлото на матката во споредба со општата популација, а се проценува дека 5% од сите случаи на карцином на грлото на матката се припишуваат на HIV.

Во најголем број на случаи карциномот на грлото на матката е предизвикан од инфекција со онкогени типови на хуман папилома вирус (HPV). Како причинители на инвазивен карцином на грлото на матката се 17-те високоризични типови на HPV кои се препознаваат како „неопходна“ причина за развој на болеста. Хуман папилома вирусот (HPV) е најчеста сексуално пренослива инфекција која може да ја афектира кожата, гениталната област, аналната област и грлото кај човекот [4].

Голем дел од сексуално активни луѓе во одреден момент ќе бидат заразени со HPV, обично без симптоми. Повеќе од 80% од жените следени со текот на одреден временски период ќе добијат барем една hrHPV инфекција, што ја покажува нејзината сеприсутна природа и леснотија на пренесување. Во повеќето случаи, имунолошкиот систем го отстранува вирусот природно односно се случува спонтан клиренс [5].

Перзистентната HPV инфекција се дефинира како повторно откривање на истата тип-специфична HPV DNA во период од 6-12 месеци. Приближно 90% од инцидентните HPV инфекции спонтано се излекуваат во рок од 2 години, при што само приближно 10% перзистираат. Токму овие жени се изложени на ризик од развој на цервикални преканцерозни лезии а со тоа и цервикален карцином [6].

Останува прашање за дебата дали вирусот е целосно елиминиран кога тестовите за HPV се негативни или перзистира во латентна состојба во базалните клетки на епителот, со потенцијал за реактивација во некои случаи при промени во имунитетот [7].

Постојаната инфекција со одредени канцерогени типови на hr HPV може да предизвика создавање на абнормални клетки кои можат да се развијат во карцином. Перзистентна HPV инфекција на грлото на матката може да доведе до развој на преканцерозни лезии кои, доколку не се лекуваат, предизвикуваат околу 95% од случаите на карцином на грлото на матката. Најчесто се потребни 15-20 години за абнормалните клетки да преминат во карцином. Кај жени со ослабен имунолошки систем, како што е нелекуваниот HIV, овој процес може да биде пократок и да трае 5-10 години. Фактори кои го зголемуваат ризикот од прогресија на карциномот вклучуваат:

- степен на онкогеност на типот на HPV,
- имунолошкиот статус на организмот,
- присуството на други сексуално преносливи инфекции,
- бројот на раѓања,
- младата возраст при првата бременост,

- употребата на хормонски контрацептиви,
- пушењето итн [6].

HPV е група од повеќе од 200 сродни типови на вируси. Сексуално преносливите типови на ХПВ се делат во две групи: со низок ризик и со висок ризик за развој на карцином.

Класификацијата на HPV е направена според канцерогениот ризик по категории, според Интернационалната агенција за истражување на карциноми и светската здравствена организација IARC / WHO. **1. Канцерогени** (сигурно канцерогени за човек – **Group 1**) Овие 12 типови на HPV имаат докажана поврзаност со карцином: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59; **2. Веројатно канцерогени (Group 2A/2B)**. Има ограничени докази, но се смета дека можат да учествуваат во канцерогенеза: HPV 68 (најчесто наведен како веројатно канцероген) како и за 53, 66; **3. Неканцерогени / низок**, овие типови не се поврзани со карцином, туку со кондиломи: HPV 6, 11 (и други ниско ризични типови) [8].

Седумнаесет генотипови на HPV се оценети како причина за инвазивен карцином на грлото на матката, но со огромни разлики во нивната канцерогена потентност. HPV типовите 16 и 18 предизikuваат приближно три четвртини од случаите на карцином на грлото на матката во сите глобални региони. HPV типовите 31, 33, 45, 52 и 58 се одговорни за дополнителни 15-20% од случаите. Останатите 10 генотипови предизikuваат само околу 5% од случаите ширум светот, со некои значајни регионални варијации, вклучувајќи поголем процент за HPV 35 во Африка отколку во други региони [1,8].

Процентата глобална, преваленца на HPV кај здрави жени на возраст над 30 години е приближно 11,7%, при што највисоката е во Субсахарска Африка со приближно 24%. Преваленцата на HPV специфична за возраста достигнува врв од 25% кај жени помлади од 25 години, што укажува дека инфекцијата претежно се пренесува преку сексуален пат по почетокот на сексуалниот однос [9].

Анатомската поставеност и достапноста на грлото на матката за визуелна инспекција и земање примероци придонесува за рано разбирање на еволуцијата на карциномот на грлото на матката. Достапноста придонесува за постојан развој на

едноставни амбулантски техники за скрининг модалитети а воедно и третман на преканцерозните лезии [10].

Докажаната ефикасност на интервентните мерки, како што е вакцинацијата против најонкогените хуман папилома вирус, централната причина за настанок на карцином на грлото на матката и скринингот, прави карциномот на грлото на матката да може да се превенира [11]. Напредок во однос на намалувањето на инциденцата и смртноста од карцином на грлото на матката, досега е забележан претежно во земјите со висок индекс на развој, каде што рутински се достапни висококвалитетни скрининг програми, навремено лекување и последователна нега.

Во земјите од низок и среден степен на развој, каде што се случуваат поголемиот дел од новодијагностицирани и смртни случаи, напредокот во намалувањето на инциденцата и морталитетот од цервикален карцином е бавен, при што голем број земји пријавиле дури и зголемување на инциденцата или стапката на смртност од цервикален карцином во изминатата деценија [12].

Во Република Северна Македонија според СЗО за 2022 година инциденцата е 6.7 на 100 000 жени а смртноста 3,5 [13].

Карциномот на грлото на матката најчесто се дијагностицира кај жени на возраст меѓу 35 и 54 години, со просечна возраст од 45 години. Повеќе од 20% од карциномот на грлото на матката се наоѓаат кај жени над 65 години. Сепак, овие видови на карцином ретко се јавуваат кај жени кои редовно правеле тестови за скринирање на карцином на грлото на матката пред да наполнат 65 години [14].

Во 2020 година, СЗО ја започнала глобалната иницијатива за забрзана елиминација на карциномот на грлото на матката, со цел да се намали инциденцата под прагот од 4 случаи на 100 000 жени-годишно во секоја земја и со тоа да ги намали меѓународните разлики поврзани со оваа болест [2,15].

Целта 90–70–90 е поставена со иницијативата која треба да се постигне до 2030 година и бара 90% од девојчињата да бидат вакцинирани до 15-годишна возраст, 70% од жените да бидат скринирани со тест со високи перформанси најмалку два пати до 45-годишна возраст и 90% од жените идентификувани со

преканцероза на грлото на матката или вистински инвазивен карцином да се лекуваат [2,15].

Карциномот на грлото на матката е предизвикан од постојана инфекција со хуманиот папиломавирус (HPV) [16,17]. Жените кои живеат со HIV имаат 6 пати поголема веројатност да развијат карцином на грлото на матката во споредба со жените без HIV [2,14]. Профилактичката вакцинација против HPV, скринингот и третман на предканцерозните лезии се ефективни начини за спречување на карциномот на грлото на матката и се многу исплатливи [2,14].

Карциномот на грлото на матката може да се излечи ако се дијагностицира во рана фаза и се лекува навремено со соодветни дијагностички и терапевтски модалитети. Земјите ширум светот работат на забрзување на елиминацијата на карциномот на грлото на матката во наредните децении со воведување на напредни скрининг методи и навремено лекување на преканцерозните лезии [14,18].

Долготрајната инфекција со високоризични типови на хуман папиломавирус (HPV) ги предизвикува практично сите видови на карцином на грлото на матката. Два високоризични типа, HPV 16 и HPV 18, предизвикуваат 70% од карциномот на грлото на матката ширум светот и претставуваат најагресивни онкогени типови за развој на цервикален карцином [19]. Скоро сите луѓе кои се сексуално активни ќе се заразат со HPV во одреден момент од нивниот живот. Повеќето ХПВ инфекции исчезнуваат сами по себе во рок од една или две години бидејќи имунолошкиот систем ја контролира инфекцијата. Овие краткорочни инфекции не предизвикуваат карцином [20].

Кога високоризичната ХПВ инфекција трае со години, може да доведе до промени во клетките на грлото на матката, што резултира со преканцерозна лезија. Ако преканцерозната лезија не е пронајдена и отстранета, таа на крајот може да се развие во вистински инвазивен карцином на грлото на матката [20].

Постојаната инфекција на грлото на матката може да предизвика неповратни промени што доведуваат до карцином *in situ* и евентуално инвазивен карцином на грлото на матката. Ова е резултат од ефектите на HPV гените, особено оние што ги кодираат E6 и E7. Интеграцијата на HPV DNA во геномот на

домаќинот индуцира изразување на E6 и E7 [21]. E7 се врзува и го инактивира протеинот на ретинобластом (pRB), што доведува до активирање на клеточниот циклус. E6 се врзува за и го инактивира протеинот p53 со што го дерегулира клеточниот циклус во синергија со инактивирањето на регулаторот на клеточниот циклус pRB од страна на E7. Експресијата на E7 и E6 може ефикасно да ги промени примарните кератиноцити што води до создавање на цервикален карцином [21].

Вообичаено, потребни се 15-20 години за абнормалните клетки да преминат во канцином, но кај индивидуи со ослабен имунолошки систем, како што е нелекуван HIV, овој процес може да биде побрз и да трае 5-10 години [22].

Факторите на ризик за прогресија на инфекцијата во инвазивен карцином вклучуваат, степен на онкогеност на типот на HPV, имунолошки статус на пациентот, присуство на други сексуално преносливи инфекции, број на породувања, млада возраст со првата бременост, употреба на хормонални контрацептиви и пушење како еден од најбитните фактори со сеуште непозната патогенеза [22].

ИНВАЗИВЕН КАРЦИНОМ НА ГРЛОТО НА МАТКАТА

Карциномот на грлото на матката може да се излекува доколку се дијагностицира и третира во рана фаза на болеста. Препознавањето на симптомите со навремена дијагноза и третман е клучен чекор во справувањето со оваа болест. Најчести симптоми за цервикален карцином се: необично крвање помеѓу менструалните циклуси, крвање во менопауза или по сексуален однос, зголемен или непријатно мирислив вагинален исцедок, симптоми како упорна болка во грбот, нозете или карлицата, губење на телесна тежина, замор и намален апетит, вагинален дискомфорт итн. [23].

Инвазивниот карцином на грлото на матката се шири директно во параметриумот, вагината, матката како и во соседните органи, односно мочниот меур и ректумот. Тој исто така се шири по лимфните патишта кон регионалните лимфни јазли, и тоа најпрво кон обтураторните, надворешните илијачни и внатрешните илијачни јазли, а потоа кон заедничките илијачни и парааорталните лимфни јазли. Далечните метастази се јавуваат преку хематоген пат во белите дробови, црниот дроб и коските и претставуваат доцна појава во текот на поодмината болеста [23].

Хистолошки типови на инвазивен карцином на грлото на матката

Светската здравствена организација (СЗО) препознава два главни хистолошки типа на инвазивен карцином на грлото на матката:

- Сквамозен карцином (сочинува околу 85% од сите случаи)
- Аденокарцином (сочинува околу 10–12% од сите случаи)

Неколку други типови, како што се аденоквамозен карцином, аденоиден цистичен карцином и метастатски карцином, ги сочинуваат преостанатите 3–5% од случаите.

Аденокарциномите се поретки. Иако секој тип е хистолошки различен, не е невообичаено во еден тумор да бидат присутни две или повеќе хистолошки форми на аденокарцином. Честата коегзистенција на жлезден и сквамозен карцином сугерира дека тие можат да имаат заедничко потекло од грлото на матката, како и заедничка етиологија. Најчестиот тип аденокарцином на грлото на матката е муцинозниот аденокарцином од ендocerвикален тип. Кај ендocerвикалниот аденокарцином се препознаваат три степени на диференцијација:

- добро диференциран
- умерено диференциран
- слабо диференциран

Степенот на диференцијација зависи од сличноста на туморските клетки со нормалниот жлезден епител на ендocerвиксот [24]. Silva класификацијата (Elvio Silva pattern-based classification) е хистопатолошки систем за проценка на HPV-асоциран ендocerвикален аденокарцином, базиран на моделот на инвазија. Таа има значајна прогностичка и терапевтска вредност, особено во однос на ризикот од лимфни метастази [24].

Хистогенетски, според актуелната класификација, аденокарциномите (ADC) од ендocerвикален аденокарцином (usual type) и муцинозен тип се поврзани со HPV инфекција. Спротивно на тоа, гастричниот, clear cell, мезонефричниот и ендometriоидниот тип се јасно дефинирани како HPV-независни. Разликувањето помеѓу HPV-асоцирани аденокарциноми (HA-ADC) и HPV-независни аденокарциноми (HI-ADC) има значајни клинички импликации. HI-ADC имаат тенденција да се јават кај повозрасни пациентки, да се дијагностицираат во повисок клинички стадиум и имаат полоша прогноза. Тие поседуваат различни молекуларни механизми па затоа разбирањето на нивните специфични карактеристики кои се клучни за туморската прогресија е од суштинско значење за развој на идни таргетирани терапии. Додека кај менаџментот на HA-ADC акцентот е ставен на HPV вакцинацијата и HPV-базираните скрининг програми, препознавањето на HI-ADC како значајна, иако помала група, е исто така клучно

за оптимизирање на стратегиите за контрола и намалување на карциномот на грлото на матката [25].

Бидејќи HPV-независните тумори, особено гастричниот тип на ендоцервикален аденокарцином, често се HPV-негативни и можат да бидат дијагностички предизвик со цитологија, актуелните алгоритми насочени главно кон HPV може да доведат до пропуштање или одложено откривање на овие случаи. [26].

Современите анализи укажуваат дека иако hrHPV-базираниот скрининг значително ја намалува појавата на сквамозни преканцерози и карциноми но, неговата сензитивност за HPV-независен аденокарцином е ограничена. Поради тоа, повеќе експертски групи препорачуваат:

- задржување на цитолошки и ендоцервикални методи на земање примероци (дури и кога hrHPV резултатот е негативен),
- евалуација базирана на симптоми (абнормално крвање, воденест или муцинозен исцедок),
- имигинг дијагностика (трансвагинален ултразвук или MRI) кај жлездани лезии со нејасно потекло [28].
- интеграцијата на молекуларна дијагностика во дијагностичката обработка, вклучувајќи метилациски панели како тријажа, како и имунохистохемиски и молекуларни маркери (на пример, експресија на MUC6 или HNF1 β , кои можат да сугерираат гастричен тип) може да ги надополни HPV-базираните програми и да овозможи порано препознавање на HPV независните случаи [27].

Реализирањето на овие дополнителни дијагностички анализи е клинички оправдано и практично применливо во реалната клиничка пракса. Идните скрининг упатства треба експлицитно да дефинираат алгоритми за HPV независни тумори, вклучително:

- цитологија како примарен тест или во комбинација со имигинг дијагностика кај симптоматски жени,

- јасно структурирани критериуми за скринирање,
- молекуларни тријажни стратегии кои не се засноваат исклучиво на вирусна детекција.

Таквите конкретни препораки би помогнале да се намали дијагностичкото каснење и да се обезбеди порано препознавање на оваа агресивна подгрупа на цервикален карцином. [28].

Невроендокрините неоплазми (NEN) се класифицираат одделно во современата класификација. Тие се ретки, но високо агресивни тумори, со висока малигност, висока смртност и лоша прогноза. Се категоризираат на:

- Невроендокрин тумор (NET)
- Невроендокрин карцином (NEC) малоклеточен тип и големоклеточен тип
- Карцином со примеси на NEC [24].

Стадиуми на Цервикален карцином:

FIGO (Интернационална федерација за гинекологија и акушерство) за цервикален карцином од 2018 година е актуелна класификација која се користи за одредување на стадиумите на болеста за цервикален карцином кои се базира на клинички, имигинг и патохистолошки наоди [24].

Менаџментот на карциномот на грлото на матката главно вклучува:

Хируршка терапија: Екстрипација на туморот со различни хируршки техники во зависност од стадиумот и обемот на болеста (на пример, хистеректомија, радикална хистеректомија, лимфаденектомија).

Радиотерапија: Надворешна зрачна терапија (EBRT) и/или брахитерапија за локално напредни случаи или кога хирургијата не е можна.

Хемотерапија: Се користи како адјувантна терапија, заедно со радиотерапија (синергистички ефект) или за напредна/метастатска болест.

Имунохистохемијата (ИНС) денес има клучна улога во дијагнозата, проценката на прогнозата и изборот на терапија кај карциномот на грлото на матката. Меѓу различните ИНС маркери, особено значајни е експресијата на PD-L1. PD-L1 тестирањето помага во идентификација на пациентки кои може да имаат корист од имунотерапија (immune checkpoint inhibitors – ICI), како што е пембролизумаб. FDA го одобри тестот за проценка на PD-L1 експресија кај цервикален карцином (22C3 pharmDx ИНС тестот). Систем на оценување за PD-L1 експресијата најчесто се проценува со Combined Positive Score (CPS). CPS се пресметува како: број на PD-L1 позитивни туморски клетки + позитивни имунолошки клетки (лимфоцити и макрофаги) поделено со вкупниот број на витални туморски клетки $\times 100$

- $CPS \geq 1$ \rightarrow се смета за PD-L1 позитивен резултат и пациентката може да биде кандидат за ICI терапија.
- $CPS \geq 10$ \rightarrow укажува на поголема веројатност за одговор на имунотерапија [24,29,30,31].

Клучен фактор за изборот на терапија зависи од стадиумот на болеста, типот на туморот, HPV статусот и здравствената состојба на пациентката, а често се користи мултимодален пристап (комбинација на хирургија, радиотерапија и хемотерапија) [24].

ПРЕВЕНЦИЈА НА ЦЕРВИКАЛЕН КАРЦИНОМ

Примарна превенција HPV вакцинација

HPV вакцинацијата претставува база за контрола на цервикалниот карцином. HPV вакцината е воведена од 2006 година кај девојчиња и момчиња на возраст од 9 години. Три вида профилактички HPV вакцини моментално се достапни за употреба за превенција на премалигни лезии и карцином на грлото на матката, вклучувајќи ги и карциномот на вулвата, вагината, анусот и орофарингеалниот карцином кои се исто така HPV асоцирани: **Двовалентни** вакцини насочени кон HPV 16 и HPV 18, **квадривалентни** вакцини насочени кон HPV 6 и HPV 11 (одговорни за аногенитални брадавици) покрај HPV 16 и HPV 18 и **деветовалентната** вакцина од втора генерација насочена кон HPV 16,18,6,11 и плус пет дополнителни типови на HPV: 31, 33, 45, 52 и 58 [32,33].

Сите вакцини се рекомбинантни вакцини составени од честички слични на вирус и не се заразни бидејќи не содржат вирусна ДНК. Вакцинацијата против HPV е безбеден и ефикасен начин за спречување на карциномот на грлото на матката.

Gardasil 9 е вакцина одобрена од FDA за жени и мажи на возраст од 9 до 45 години во САД [34]. Gardasil 9 е одобрен за спречување на преканцерози и карциноми предизвикани од седум HPV типови кои предизвикуваат карцином (16, 18, 31, 33, 45, 52 и 58) и за спречување на генитални брадавици предизвикани од типови HPV 6 и 11 [34].

Се препорачува рутинска вакцинација против HPV за девојчиња и момчиња на возраст од 11 или 12 години, а вакцината може да се дава почнувајќи од 9-годишна возраст и се препорачува до 26 годишна возраст со можност за пролонгирање до 45 та година. HPV вакцината се дава како серија од две или три дози во зависност од возраста. HPV вакцинацијата се администрира како: Серија од две дози (0, 6-12 месеци) за повеќето лица кои започнуваат со вакцинација на возраст од 9 до 14 години и серија од три дози (0, 1-2, 6 месеци) за лица кои започнуваат со вакцинација на возраст од 15 до 45 години и за

имунокомпромитирани лица. Пациентите со имунокомпромитиран имунитет мора да примат три дози (на 0, 1-2 и 6 месеци) [34].

Препораките за дозирање што се следат глобално се многу варијабилни. Моментално, 80 земји имплементираат режим со две дози, а повеќе од 60 земји го имплементираат режимот со единечна доза во своите национални програми. [33].

HPV вакцините се со висока имуногеност, антителата генерирани по вакцинација се 10–100 пати повисоки од оние по природна инфекција. Порана администрација на вакцината резултира со поголема имуногеност. Повеќе од 98% од примателите развиваат одговор на антитела кон типовите на HPV вклучени во соодветните вакцини еден месец по завршувањето на целосната серија на вакцинација. Дополнително сеуште не е утврден минимален титар на антитела потребен за соодветна заштита. Сите HPV вакцини имаат висока ефикасност (близу 100%) за превенција на перзистентна инфекција поврзана со типот на HPV вакцина од цервикална интраепителна неоплазија CIN 2+ и аденокарцином *in situ* (AIS). Безбедноста на HPV вакцините се разгледува континуирано, а вакцините се покажале како безбедни без несакани ефекти кои се почести кај вакцинираните лица во споредба со општата популација [33].

Полово неутралната вакцинација обезбедува директна заштита кај мажите од HPV асоцирани карциноми и ја намалува можноста мажите да бидат трансмитери на HPV вирусот со што се намалува инциденцата за пренос на HPV вирусот. Вакцините се ефикасни и кај сексуално активни жени со претходни, но излечени HPV инфекции. Жените кои се лекувани за лезии од висок градус - HSIL (екцизиони или локални аблативни техники) на грлото на матката имаат зголемен ризик од последователни заболувања поврзани со HPV. Адјувантниот периперативен третман со HPV вакцина кај оваие пациентки покажува намалување на рекурентноста на болеста по третманот. Вакцинацијата, покрај локалниот третман на болести поврзани со HPV ги намалува рекурентните или последователните болести поврзани со HPV [35].

Во Република Северна Македонија во редовниот календар е воведена деветовалентната вакцина за момчиња и девојчиња од 9 до 19 години и во зависност од возраста се аплицираат две или три дози.

Вакцината за HPV е клучна за јавното здравје. Финансиските прашања околу вакцината се главната бариера за вакцинација против HPV и токму затоа различни земји имплементираат различен дозен резим и различни валентни вакцини [3,36].

Секундарна превенција / Скрининг

Скринингот е важна стратегија во глобалната елиминација на карциномот на грлото на матката. Иако вакцинацијата против HPV има за цел да спречи неоплазија на грлото на матката со спречување на HPV инфекцијата, скринингот има за цел рано да открие преканцерозни лезии на грлото на матката, како што се цервикална лезија од висок градус CIN и аденокарцином *in situ* (AIS), кои ефикасно ќе се третираат за да се спречи инвазивен карцином со што ќе се намалат стапките на смртност од карцином на грлото на матката.

Затоа скринингот останува приоритет во превенција на карциномот на грлото на матката неколку децении наназад. Досега се проучувани различни модалитети на скрининг за цервикален карцином.

Многу децении, скринингот за карцином на грлото на матката се базирал исклучиво на цитолошка анализа на цервикалните клетки [37].

Во многу земји и денес, скринингот се уште се заснова на цервикална цитологија, каде што цервикалните клетки добиени со четкичка се фиксираат на стакло и испитуваат под микроскоп [37].

Ова може да се изврши со конвенционална цитологија (CC) или со цитологија базирана на течност (LBC) [37]. Алтернативата на PAP тестовите е LBC. Двата теста за земање примероци се валидирани од Американската агенција за храна и лекови (FDA). Примерокот се добива со помош на четка или комбинација од четка и шпатула кои потоа се ставаат и плакнат во течен медиум. LBC во многу земји, ја заменила конвенционалната цитологија CC бидејќи нуди подобри

придобивки поради пониската стапка на несоодветни тестови за интерпретација, околу 1% во споредба со 7% во конвенционалната цитологија [38].

LBC има повеќе предности. Овозможува полуавтоматизирана изработка на препаратите и отстранување на нечистотии, еритроцити, воспалителни клетки и артефакти, со што се добива униформен, тенок слој од епителни клетки кој е полесен за интерпретација од страна на цитопатолозите. Овој метод овозможува и автоматизирано читање на размаските. Покрај тоа, LBC може да се користи за последователни дополнителни молекуларни и имуноцитохемиски анализи. Цервикалните брисеви се класифицирани според системот Bethesda 2014 [39].

Сепак, фактот дека огромното мнозинство на карциноми на грлото на матката се резултат на постојана инфекција со високоризични хумани папиломавируси (hr-HPV) доведе до спроведување на примарен HPV скрининг во многу земји. Тестирањето за HPV е недвосмислено најдобриот метод за скрининг, со највисока сензитивност и најдобра негативна предикативна вредност [19].

Цитологијата се употребува како примарен скрининг тест во 78% од земјите кој спроведуваат скрининг програми за цервикален карцином, при што 35% од земјите препорачуваат примарен скрининг базиран на високоризичен HPV. Визуелната инспекција со оцетна киселина (VIA) е препорачан тест во услови со ограничени ресурси, најчесто земјите од Субсахарска Африка и делови од Азија [40].

Во моментот, постои глобален напор за транзиција од цитолошки кон примарен HPV базиран скрининг. Тој е воведен во Австралија и Велика Британија во 2017 и 2019 година, соодветно. Многу земји во Европа, исто така, спроведуваат скрининг за HPV на национално или регионално ниво како што се Холандија, Шведска, Турција, Финска и Италија [41].

Воведувањето на програма за скрининг за карцином на грлото на матката во една земја треба да биде прецизирана со упатства кои јасно ја означуваат целната возрастна група, скрининг тестот и интервалите за повторување на скринингот. Со упатство детално се елаборираат методите за достигнување до целната популација на жени, менаџментот со жени позитивни на скрининг тестот, упатување за тријажа

и лекување, методите на лекување (криотерапија, термичка аблација, ексцизија на трансформациската зона – LLETZ) за CIN лезии и воспоставување на критериуми за видот на третман откриени со скрининг програмите.

Достапноста на соодветна инфраструктура и обучени човечки ресурси е клучна за иницирање и одржување на програмата за скрининг. Информациски систем со програма поддржан од база на податоци и поврзаност со други информациски системи како што се национален регистер на рак, регистри на смртност и бази на податоци за здравствено осигурување е важен за следење и евалуација. Избраната стратегија за скрининг мора да биде изводлива, едноставна, безбедна, точна, прифатлива и лесно достапна за жените со највисок ризик [42].

Повеќето упатства препорачуваат скрининг на секои 5 години за жени по возраст од 20-30 години, со варијабилни крајни точки од 64-74 години.

Цитолошки базираниот Папаниколау тест и примарниот HPV скрининг широко се употребуваат во идентификација на цервикалниот карцином и неговите преканцерозни лезии во различни земји во светот. Цитологија комбинирана со HPV тестирање многу често се изведуваат заедно за подобрување на скринингот на пациентки за цервикален карцином [43,44].

СЗО препорачува користење на HPV DNA тестирање како примарен скрининг тест наместо цитологија во пристапите за скрининг и третман кај опитата популација на жени и жени кои живеат со HIV[45].

При скринирањето со HPV DNA како примарен скрининг тест кај опитата популација на жени, СЗО предлага користење на делумна генотипизација за HPV 16 и 18, цитологија или колпоскопија во тријажата на пациентките позитивни на HPV DNA. Придобивките од изборот на методот на тријажа ќе зависи од изводливоста, обуката и обезбедувањето на квалитетни ресурси во земјите во светот. Генотипизацијата за HPV16/18 може да се интегрира во HPV DNA тестирањето [45].

СЗО предлага редовен скрининг интервал на секои 5 до 10 години кога се користи HPV DNA детекција како примарен скрининг тест кај опитата популација на жени [45].

Онаму каде што HPV DNA скринирањето сè уште не е имплементирано, СЗО предлага редовен скрининг во интервал на секои 3 години со цитологија или колпоскопија како примарен скрининг тест меѓу опитата популација на жени и жени кои живеат со HIV [13,45].

Современите скрининг-алгоритми се фокусираат на откривање на HPV-асоцирана болест преку примарно тестирање за високоризичен HPV (hrHPV), со цитологија како тријажа или како ко-тест.

Во САД, нацрт-препораките на USPSTF (The US Preventive Services Task Force) од 2024 година предлагаат:

- цитологија на секои 3 години кај жени на возраст 21–29 години;
- за возраст 30–65 години, примарно hrHPV тестирање на секои 5 години (со примерок земен од здравствен работник или самоземен од пациентката во клинички услови), при што ко-тестирањето (hrHPV + цитологија) или цитологија самостојно се прифатливи алтернативи. [46].

Дополнително, најновите упатства на ASCCP (The American Society for Colposcopy and Cervical Pathology) од 2025 година формално ја вклучуваат употребата на самоземени вагинални примероци за hrHPV тестирање во клинички услови [47].

Новите тријажни пристапи, како што се панелите за DNA метилација, се во фаза на евалуација со цел да се подобри специфичноста по иницијален позитивен HPV тест.

HPV тестирањето ја заменува цитологијата бидејќи нуди поголема заштита од карцином на грлото на матката и овозможува подолги интервали на скрининг. Скринингот задолжително треба да продолжи и кај вакцинираните пациентки, но фреквенцијата на скринингот можеби треба да се модифицира односно да се намали интервалот на тестирање. Самотестирањето (self-sampling) за вискоризичен HPV кај пациентки кои имаат ограничена достапност до здравствени установи односно лекар дава ветувачки резултати [48].

Придобивките се особено изразени кај glandуларните заболувања. Тестот за високоризичен HPV (hrHPV) е објективен метод со мала меѓулабораториска варијабилност. Може да се изведува во централизираните лаборатории, што овозможува подобра контрола на квалитетот и бара минимално техничко знаење за добивање сигурни резултати [49].

Ова ја намалува потребата од обучени цитотехничари, чие обучување и континуирана ревалидација може да биде тешко изводлива во помалку развиени средини. Главниот недостаток на hrHPV тестирањето е неговата ниска специфичност, во споредба со цитологијата, бидејќи тестот може да открие транзиторни HPV инфекции без вистински канцероген потенцијал. Затоа, примарен hrHPV скрининг не се препорачува кај жени под 30 години, поради високата преваленца на транзиторни инфекции во оваа возрастна група. Тестовите за HPV се базирани на PCR технологија но, повеќето тестови детектираат HPV DNA, исклучок се неколку кој се RNA-базирани [50].

Цитологијата покажува висока специфичност но релативно ниска сензитивност од 30 до 80% за детекција на цервикален карцином [51,52]. Овој метод има ниска сензитивност поради високата стапка на лажно-негативни резултати. Сензитивноста на HPV тестот е висока околу 90% но, специфичноста е мала, со висока негативна предиктивна вредност [37,43,51]. Затоа детекцијата на високо ризичен HPV се употребува за подобрување на сензитивноста на цитологијата [51,53,54].

Цервикални лезии од лесен степен како ASCUS / LSIL вообичаено бараат следење бидејќи може да прогредираат во лезии од висок степен, карцином *in situ* и инвазивен карцином [51,54,55].

Поради ниската специфичност кај HPV DNA тестирањето, многу жени ќе бидат упатени на колпоскопија, особено млади жени под 30-годишна возраст бидејќи кај таа популација има највисока преваленца на HPV. Преваленцата на hrHPV варира од 80% до 85% кај жени со LSIL. Тие пациентки или директно се упатуваат на колпоскопија или се следат со цитологија [55,56].

При позитивен тест скрининг тест за ХПВ типизација доколку цитологија се употреби како тријажен тест и докаже присуство на ASC-US или LSIL потребно е пациентката да се упати на колпоскопија/ биопсија. Ако резултатот е нормален, жените се повторно тестираат за HPV по 12 месеци или за цитологија по 6–12 месеци [48,57].

Според упатствата на FDA за примарен HPV скрининг, жените со позитивен HPV16 или HPV18 веднаш биле упатувани на преглед со колпоскопија, додека жените со позитивен HPV, но негативни HPV16 или HPV18 биле испитувани со цитологија. Ако цитологијата е негативна, тие ќе бидат следени 12 месеци подоцна. Многу пациентки со позитивен HPV имаат потреба од повторено цитолошко следење поради релативно ниската сензитивност на цитологијата [56].

HPV позитивните пациентки со нормална цитологија и лесна форма на дисплазија на цитологијата е потребно постојано да се следат со цел навремено утврдување на транзицијата на лезиите од понизок градус во потенцијални лезии од висок градус. Затоа, потребен е поефикасен маркер за тријажа на HPV позитивни пациентки со нормална цитологија и да се идентификуваат жените со потенцијален повисок градус CIN2+ од цитолошките ASCUS/LSIL [55,56].

Имајќи го предвид фактот дека поголемиот дел од HPV инфекциите се минливи и не предизвикуваат преканцер на грлото на матката, потребни се ефективни методи за тријажа на пациентките за да се спречат зголемувањата на упатувањата за колпоскопија и биопсија. [58,59].

ТРИЈАЖНИ ТЕСТОВИ

Најобемно истражувани тријажни тестови по спроведување на примарниот скрининг се: генотипизацијата на HPV, метилацијата на HPV и двојното цитолошко боење со p16/Ki67.

HPV генотипизација – овозможува идентификација на високоризични типови кои се поврзани со повисок ризик за прогресија кон лезии од висок градус или карцином. Генотипизацијата може да се користи за селекција на жени кои веднаш треба да бидат упатени на колпоскопија [48].

Метилација на HPV – анализа на метилацијата на специфични човечки или вирусни гени (на пр. FAM19A4, hsa-mir124-2, EPB41L3, MAL1, HPV16L1/L2, HPV18L2) како индикатор за перзистентна и потенцијално канцерогена инфекција. Метилациските тестови овозможуваат подобра специфичност во откривање на лезии кои се клинички релевантни [48].

Вирусна концентрација- потребни се дополнителни анализи за валидирање и прилагодување на вредностите според бројот во примерокот и интерпретација на резултатот за клиничко значење при постоење на инфекција со HPV [48].

Двојно боење (dual staining) p16/Ki67 – претставува имунообојување кое ја идентификува активната биолошка клеточна трансформација предизвикана од високоризични HPV инфекција. p16/Ki-67 двојното боење (CINtec® PLUS Cytology) е одобрено од FDA во март 2020 година за тријажа на пациентки со позитивен високоризичен HPV (hrHPV) резултат добиен на HPV скринингот или по резултат од цитологијата кој одговара на лезија од низок градус [60,61].

Овој тест идентификува трансформирани цервикални клетки со HPV инфекции преку детекција на двата маркери (p16 и Ki-67) во истата цервикална епителна клетка. Ко-експресијата на овие протеини укажува на нарушена регулација на клеточниот циклус предизвикана од онкогените HPV протеини. [62].

Со тоа се овозможува подобра стратификација на ризикот во споредба со конвенционалната цитологија, односно попрецизно идентификување на жените со зголемен ризик за CIN2+ лезии и потреба од понатамошна колпоскопска односно хистолошка евалуација [63].

P16/KI67 ДВОЈНО БОЕЊЕ (DUAL STAINING) ИМУНОЦИТОХЕМИЈА

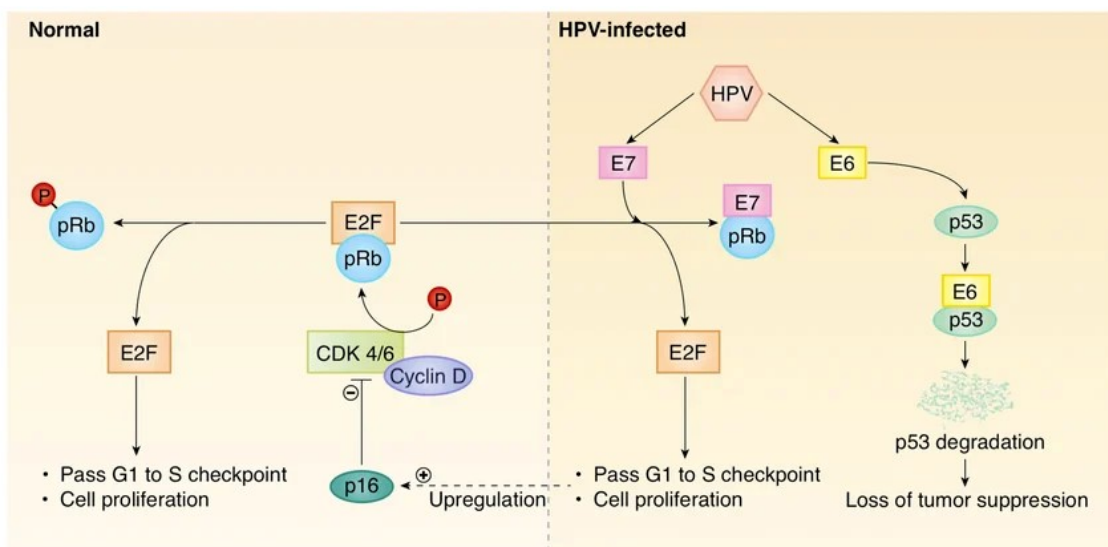
Двојното боење p16/Ki67 е имуноцитохемиската метода од две боења која се изработува на цитологија базирана на течност (LBC) во потполно автоматизиран апарат со детектирање со моноклонални антители за p16 и Ki67 [64]. p16/Ki67 двојното цитолошко боење претставува алтернативен биомаркер со висока сензитивност и специфичност кој идентификува цервикални лезии од висок градус (CIN 2+). p16 е инхибитор на циклин зависна киназа и делува како регулаторен протеин на клеточниот циклус, Ki-67 е клеточно пролиферативен маркер [51,58,65]. Во физиолошки услови тие не може да бидат изразени во истата цервикална епителна клетка. Коекспресијата на овие две молекули сугерира дерегулација на клеточниот циклус и може да користи за предикција на присуство на цервикални лезии од висок градус [51,66,67,69].

Воведувањето на таков биомаркер за тријажа и идентификација на цервикални лезии од висок градус кај пациенти според прелиминарните резултати од скринингот од цитологија (ASCUS/LSIL) и HR-HPV DNA тестирањето е неопходен [70,71,72,65].

p16INK4A (p16) е тумор супресорен протеин, познат како циклин-зависен киназа инхибитор 2A (CDKN2A). Тој е кодиран од генот CDKN2A лоциран на краткиот крак на хромозомот 9 (9p21.3). p16 може да се поврзе со CDK4 и CDK6, што игра важна улога во регулирањето на клеточниот циклус. CDK4/6 нормално формира протеински комплекс со циклин D за фосфорилирање на pRB (протеин на ретинобластом). По фосфорилацијата, pRB се разделува од факторот на транскрипција E2F1, што доведува до E2F1 транслокација во јадрото, каде што E2F1 индуцира транскрипција на целните гени кои промовираат клеточна транзиција од G1 фаза во S фаза. Затоа, p16 делува како CDK инхибитор со тоа што ја спречува неговата интеракција со циклинот D, следствено, забранувајќи ја прогресијата на клеточниот циклус. Намалувањето на p16 може да доведе до дисплазија преку дисрегулација на прогресијата на клеточниот циклус. Генот p16

често мутира кај многу видови на карциноми, а намалувањето на експресијата на p16 е поврзано со зголемен ризик од карцином [51,73,75,76,135].

Во клетките со HPV инфекции, протеинот E7 се натпреварува за врзување на регулаторните протеини на клеточниот циклус pRB, што резултира со ослободување на E2F1 од pRB и активирање на клеточниот циклус. Нарушувањето на патеката pRb-E2F1 од страна на E7 предизвикува прекумерна експресија и акумулација на p16 во клетките преку **негативна повратна врска**. Силната и дифузна цитоплазматска и нуклеарна експресија на p16 кај цервикалните сквамозни карциноми е претежно поврзана со HR-HPV инфекција. Затоа, p16 се смета за сурогат маркер за перзистентна HR-HPV инфекција и е забележана прекумерна експресија на p16 кај повеќето преканцери на грлото на матката и карциноми [73,74,75,76,135].



Слика 1. Онкогенеза кај ХПВ инфицирана клетка

Лев панел: Нормална, неинфицирана клетка. Десен панел: HPV-инфицирана клетка. [135].

Ki67 е маркер за пролиферација на клетки, првпат дефиниран според градот Кил и бројот на оригиналниот клон. Ki-67 е нуклеарен нехистонски протеин, кој е кодиран од генот Mki-67 и изразен во сите фази од клеточниот циклус, освен за време на фазата G0. Ki-67 врши повеќе функции во регулирањето на прогресијата

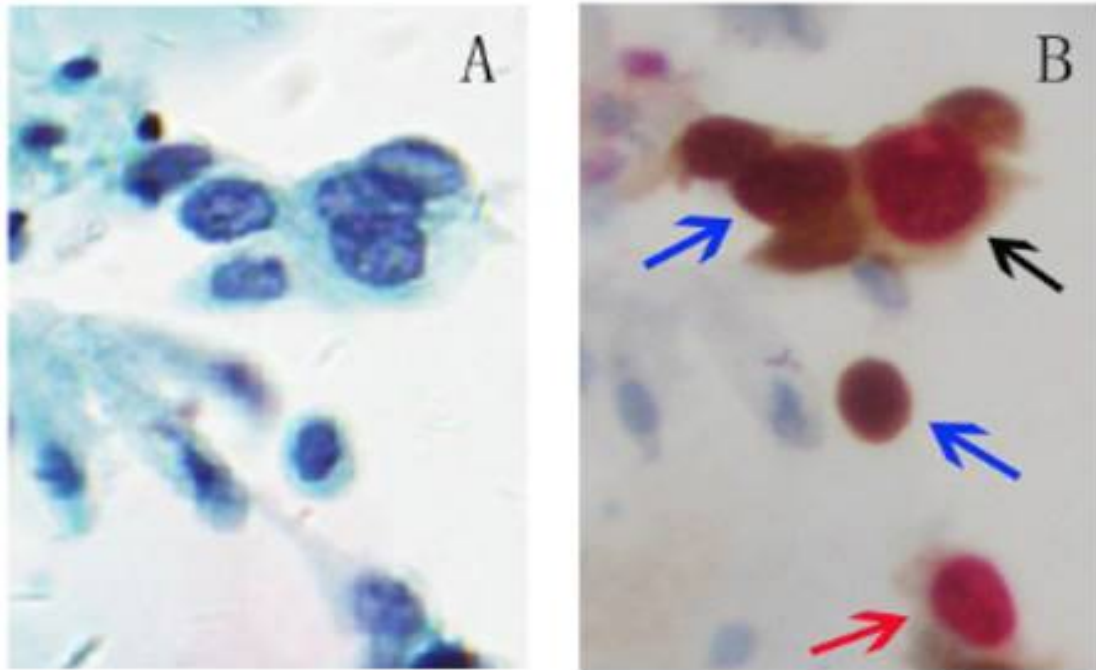
на клеточниот циклус. Со прогресијата на клеточниот циклус, тој игра различни улоги, што е поврзано со неговата дистрибуција во клетките. Ki-67 е потребен за нормална клеточна дистрибуција и нуклеоларно поврзување на хетерохроматин за време на интерфазата. За време на митозата, Ki67 е вклучен во формирањето на перихромозомскиот слој, кој функционира како заштитна обвивка околу хромозомите и обезбедува платформа за време на нуклеоларното склопување, каде што Ki-67 служи како биолошки сурфактант за спречување на агрегација на митотичните хромозоми по расклопување на нуклеарна обвивка [51,77,78].

Како маркер за пролиферација на клетките, Ki-67 го предвидува малигниот потенцијал на туморите. Откривањето на Ki-67 е широко користено во помошната дијагноза на цервикалните преканцерози и карциноми [77,78].

p16 е туморски супресор, а Ki67 е клеточен маркер за пролиферација [51,64,66,70]. Прекумерното експресија на p16 и присуство на Ki-67 во физиолошки ситуации меѓусебно се исклучуваат и не се јавуваат во истата цервикална епителна клетка. Затоа, ко-експресијата p16/Ki67 подразбира дерегулација на клеточниот циклус индуциран од HR-HPV и откривањето на ко-експресијата на p16/Ki67 може да послужи како маркер за предвидување на клеточната трансформација од HR-HPV и присуството на CIN лезии од висок градус (CIN 2+) [51,65,66,70,79].

Ко-експресијата на p16/Ki-67 се детектира со употреба на антитела насочени против p16 и Ki-67 протеините. Цервикални епителни клетки кои се истовремено обоени за p16 и Ki-67 ќе бидат класифицирани како позитивни без оглед на морфолошкиот изглед на клетките. p16 имунообојување: дава кафеав сигнал (цитоплазматски и/или нуклеарен). Ki-67 имунообојување: дава црвен нуклеарен сигнал. Кај позитивни dual-stain клетки, се забележува: кафено цитоплазматско обојување кое ја одразува експресијата на p16, и темно-црвено до црвено-кафено нуклеарно обојување, кое ја одразува ко-локализацијата на p16 и Ki-67 во истата клетка.

Наодите се класифицираат како позитивни доколку се присутни една или повеќе цервикални епителни клетки кои истовремено се обоени за p16 и Ki-67, без оглед на морфолошкиот изглед на клетките.



Слика 2. Препаратот е двојно обоен со p16/Ki-67: Клетка само со p16 обојување - **сина стрелка**: Кафен цитоплазматски/нуклеарен сигнал. Клетка само со Ki-67 обојување - **црвена стрелка**: Црвен нуклеарен сигнал. **Позитивна p16/Ki-67 dual-stain клетка -црна стрелка**: Кафен цитоплазматски сигнал - p16 експресија. Темноцрвен нуклеарен сигнал -ко-експресија на p16 и Ki-67 во иста клетка. Препаратот се класифицира како **dual-stain позитивен**, бидејќи постои најмалку една клетка со истовремена експресија на p16 и Ki-67 [51].

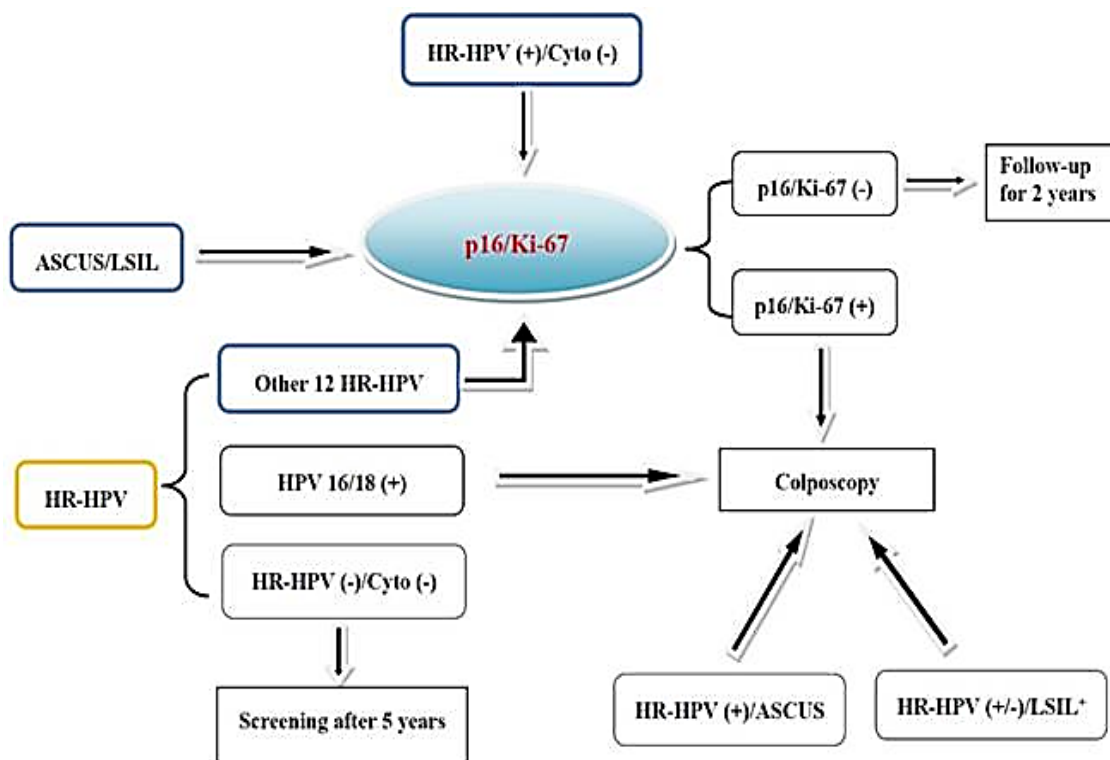
Овој пристап овозможува објективна идентификација на клетки со HPV-индуцирана клеточна дерегулација и претставува важен тријажен алат кај HPV-позитивни жени. [51,80].

Позитивното p16/Ki67 двојно боее е поврзано со HR-HPV инфекција, особено со HPV 16/18. Позитивната стапка на p16/Ki67 кај HPV-позитивните жени е 78,9%, значително повисока од 9,4% кај HPV негативните пациентки [51,79]. Поврзаноста на позитивноста на p16/Ki67 со HPV16 или 18 инфекции е 2-4 пати посила во споредба со случаите инфицирани со други типови HR-HPV [81].

Позитивноста на двојното боење на p16/Ki-67 силно укажува на CIN2+ или сквамозна интраепителна лезија од висок градус (HSIL) [82].

Позитивните стапки на p16/Ki67 двојно боење кај HR-HPV позитивни жени со дијагнози негативни за интраепителијална лезија или малигнитет (NILM), ASCUS, LSIL, ASC-H и HSIL се 3,0%, 23,6%, 25,8%, 78,6% и 100,0%, соодветно. Позитивната стапка се зголемува од 31% кај жени со негативна цитологија на 92% кај жени со HSIL. Позитивниот наод на p16/Ki67 кај жени со CIN3 е 86%. Сите пациенти со вистински инвазивен карцином на грлото на матката покажуваат позитивно p16/Ki67 двојно цитолошко боење [51].

Позитивната стапка на p16/Ki67 значително се зголемува со сериозноста на цитолошките и хистолошките абнормалности. Сензитивноста и специфичноста на p16/Ki67 двојното цитолошко боење за CIN2+ се 74,9%-90,9% и 72,1%-95,2%, соодветно. Позитивната стапка на CIN2+ откриена со двојно боење на p16/Ki-67 е 92,7%, што е посензитивно од 71,1% само со генотипирање на HPV16/18 [51,83]. Во споредба со откривањето на HPV, двојното боење p16/Ki-67 има поголема специфичност во откривањето на CIN2+ и може значително да го намали бројот на пациенти упатени на колпоскопија, особено за млади жени со висока стапка на HPV инфекција [84,85].



Слика 3. Скрининг на карцином на грлото на матката со примена на p16/Ki-67 двојното цитолошко боење. Пациентките дијагностицирани како ASCUS/LSIL, или позитивни за HR-HPV и без цитолошки абнормалности, или позитивни за останатите типови на HR-HPV а негативни за HPV 16 и 18, се препорачуваат за тријажа со p16/Ki-67 двојна боење [51].

Тријажа на HPV позитивни пациентки

Резултатите од HPV инфекцијата многу варираат, а следењето на HPV позитивните пациентки е комплицирано и макотрпно. За да се елиминира непотребното следење, на hr HPV DNA позитивните пациентки треба навремена тријажа. Цитологијата обично се користи за тријажа на HPV позитивни пациентки кои се негативни на HPV16 или 18. Сензитивноста на p16/Ki-67 двојното боење за тријажирање на HPV позитивни пациентки е 74,9%, значително повисока од сензитивноста од 51,9% од цитологијата на ПАП. За време на цитолошкиот скрининг, колпоскопијата обично се препорачува за жени со поголем преканцерозен ризик [56,59]. Потврдено е кај HPV позитивните пациентки дека преканцерозниот ризик кај жените со позитивно p16/Ki67 двојно боење е многу

повисок компарирано со цитологијата, додека ризикот кај жени со негативно двојно цитолошко боење за p16/Ki67 е помал, што понатаму укажува на потенцијалната улога на методата со двојно боење за тријажа на HPV позитивни пациентки [56,59]. (Слика 1)

Околу 3-7% од жените со нормална PAP цитологија и hr HPV DNA позитивитет сè уште страдаат од CIN лезија од висок градус (CIN2+). p16/Ki-67 двојното цитолошко боење може да се користи за тријажа на овие пациенти. Сензитивноста за откривање на CIN2+ и CIN3+ 91,9% и 96,4% , соодветно, додека специфичноста е 82,1% и 76,9%. Сензитивноста за CIN2+ лезии е значително повисока од генотипизацијата за HPV16/18 [51].

Следењето на HPV позитивните пациентки со нормална цитологија со 5-годишните кумулативни ризици за инциденца за CIN2+ и CIN3+ се 12,2% и 6,9%, соодветно. Дури и ако генотипот на HPV16/18 е негативен, 5-годишниот кумулативен ризик за CIN3+ е 3,6%. Ако овие жени се негативни за p16/Ki-67, 5-годишниот кумулативен ризик за CIN3+ се намалува на 3,3%. Затоа, двојното боење p16/Ki-67 е погодно за триажирање на HPV позитивни пациентки со нормална цитологија за да се идентификуваат пациенти со голема веројатност за потенцијални лезии од висок градус CIN2+ [51,56,59].

Тријажа на пациентки со LSIL/ASCUS цитологија

Жените дијагностицирани како ASCUS и LSIL имаат 2,6% и 5,2% 5-годишен ризик за CIN3+, соодветно. Затоа, од суштинско значење е да се идентификува потенцијалниот HSIL од ASCUS/LSIL. Ефикасноста на p16/Ki-67 двојното боење е проценета и потврдена. Специфичноста на двојното боење на p16/Ki-67 за откривање на CIN3 е 75,2%, значително повисока од 40,4% од тестовите за hr HPV DNA, иако сензитивноста кај првото е малку помала [51,87]. (Слика 2)

p16/Ki-67 двојното боење има повисока специфичност и слична сензитивност во однос на HPV тестирањето. Двојното боење p16/Ki-67, исто така, покажува висока позитивна предиктивна вредност за CIN, особено кај жени под 30-

годишна возраст, што може да го намали бројот на непотребни упатувања за колпоскопија односно биопсија [51,58,65].

Мониторирање на повторувачки лезии

Комбинацијата на p16/Ki-67 двојно боење и детекција на HR-HPV може да се користи и за следење на повторувачки лезии (rCIN2+). Пациентки третирани за CIN2+ лезии може да рецидивираат и треба внимателно да се следат. Цитологијата и детекција на HR-HPV се препорачува како дополнителна стратегија за овие пациенти за да се избегне губење на потенцијални hr HPV негативни CIN2+ лезии [88,89].

Специфичноста на цитолошката детекција или комбинираното тестирање со цитологија и HPV е ограничена. Сензитивноста и специфичноста на цитологијата, откривањето на HR-HPV DNA и двојното боење на p16/Ki-67 за повторувањки лезии (rCIN2+) се 82,1%, 84,6% и 69,2%, соодветно, но специфичноста на p16/Ki-67 е 90,4%, што е значително повисока од 70,8% за цитологијата и 76,2% за HR HPV тестирањето. Сензитивноста на комбинираната детекција на p16/Ki67 и HR HPV е слична на цитолошката со HR-HPV ко-детекција (87,2% наспроти 89,7%), но специфичноста е значително подобрена (74,2% наспроти 58,1%), што резултира со повисока позитивна предиктивна вредност и помалку упатувања за колпоскопија [51,88,89].

Цитолошката дијагноза на лезиите на цервикалните жлезди често е тешка поради тешкотијата да се разликуваат воспалителни или хиперпластични промени од неоплазија. Двојното боење на p16/Ki-67 е потенцијален алатка за дијагноза на лезии на цервикалните жлезди [51,90].

Цитологијата со p16/Ki-67 двојното цитолошко боење е од големо значење за скрининг и тријажирање на карциномот на грлото на матката и неговите преканцерозни лезии. Оваа метода е ветувачка за намалување на бројот на непотребни колпоскопии и биопсии. Може да биде користена за предвидување на регресија или прогресија на CIN2 лезии (како гранична лезија за третман). Во

споредба со цитологијата и откривањето на HPV, таа има поголема сензитивност во откривањето на преканцерозните лезии на грлото на матката и карциномот на грлото на матката. p16/Ki-67 двојно боење се препорачува како стратегија за следење на жените третирани за преканцерозна лезија [51,58].

Вакцинацијата против ХПВ во моментот е вклучена во националните програми на над 140 земји во светот. Вакцинација со две дози се спроведува во 80 земји и вакцинација со една доза во околу 60 земји од светот.

Скринингот доживеа голем напредок со пошироката имплементација на тестирањето за HPV, вклучувајќи ја и опцијата за самостојно земање примероци, преносните уреди за скрининг, како и вклучувањето на вештачка интелигенција AI во скринирањето. Дијагностичката точност се подобрува со имуноцитохемијата.

Хируршкиот третман на инвазивен рак е револуциониран со можноста за конзервативна хирургија во многу рани фази, минимизирајќи ги компликациите и несаканите ефекти и нудејќи можност за зачувување на плодноста. Новите податоци за минимално инвазивната хирургија ја редефинираат улогата на лапароскопијата и роботската хирургија во раните фази со мала големина на туморот.

Евалуацијата на лимфните јазли-сентинел е нова алтернатива на целосната лимфаденектомија. Имуноterapiјата отвара нови можности за менаџментот на рекурентна или напредна метастатска болест.

Менаџментот на карциномот на грлото на матката пред се зависи од стадиумот на болеста, вклучувајќи прашањата поврзани со квалитетот на животот и фертилитетот. Мал дел од карциномите на грлото на матката се дијагностицираат во тек на бременост. Тие претставуваат предизвик за спроведувањето на онколошкиот третманот кој секако зависи од желбата на пациентот, гестациската недела и одлуките на мултидисциплинарниот тим [10,1].

МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДОКТОРСКАТА СТУДИЈА

Со оглед на фактот дека HR-HPV DNA детекцијата се етаблира како скрининг метода во се поголем број од развиените земји, а кон која тежнеат и земјите во развој, огромен е и предизвикот за понатамошен менаџмент на пациентките, кои ќе бидат позитивни, со овој начин на тестирање. Поради високата сензитивност (со висока негативна предиктивна вредност) на тестот а ниската специфичност на тестот за присуството на лезии од висок градус, CIN2+ лезии.

Од друга страна менаџментот на пациентките во земјите кај кои што цитологијата сеуште претставува прва линија за скрининг за цервикален карцином е вистински предизвик поради неговата ниска сензитивност пред се поради големиот број на лажно негативни резултати.

Оттука се јавува потребата за нов тријажен тест кој ќе тријажира односно ќе биде надополнување на постоечките скрининг програми, со кои ќе се намали бројот на непотребни упатувања на пациентките на колпоскопија (медицинска дијагностичка процедура со која се врши визуелен преглед на грлото на матката како и на вагината и вулвата, со помош на специјален инструмент наречен колпоскоп) односно биопсија за добивање на патохистолошки наод. За p16/Ki67 двојното цитолошко боење како тријажен тест од оваа студија се очекува да ни даде одговор на прашањата за присуството на сквамозни интреепителни лезии од висок градус (CIN2+ лезии), кај пациентки кој имаат HR-HPV DNA позитивен наод, позитивен наод на цитологија за LSIL или двоен позитивитет кај пациентки кај кои е направено котестирањето.

Апликабилноста на p16/Ki67 двојното цитолошко боење уште на самиот почеток во дијагностичките алгоритми во тријажирањето на пациентките со цервикалните преканцерози и цервикален карцином претставува значајна алатка која ќе може да ја користат клиничарите се со цел пронаоѓање на лезии од висок градус. Истовремено и најзначајно очекуваме ваквите резултати да имаат позитивни импликации преку подобрување на скрининг програмите за цервикалниот карцином а со тоа во подобрување на здравјето и исходот од

третманот на пациентките во борбата против цервикалниот карцином и неговите преканцерозни лезии во нашата популација.

Дополнително ова истражување претставува прва систематски дизајнирана научно истражувачка студија во нашата држава од оваа област.

ЦЕЛИ

1. Корелација помеѓу p16/Ki67 имуноцитохемиски наод со хистолошки верифицираната сквамозна интраепителна лезија.
2. Корелација на p16/Ki67 имуноцитохемиски статус со цитолошки верифицирана сквамозна интраепителна лезија.
3. Корелација на p16/Ki67 имуноцитохемискиот наод со високоризични HR-HPV DNA типови (HPV тип 16 и 18 , како најонкогени типови и останати високоризични HPV типови)
4. Корелација на цитолошките со хистолошките наоди од биопсија.
5. Утврдување на вредноста на p16/Ki67 двојното цитолошко боење во корелација со сите горенаведени скрининг методи кај преканцерозни лезии од групата LSIL и HSIL на грлото на матката и цервикален карцином.

ХИПОТЕЗА

Постои поврзаност на позитивниот наод за p16/Ki67 двојното цитолошко боење со присуството на цервикални лезии од висок градус (CIN 2+ лезии) докажани со хистолошка верификација.

МАТРИЈАЛ И МЕТОДИ

Студијата е дизајнирана како пресечна студија на кохорта. Во студијата учество земаа 145 пациентки на возраст од 18-79 години. Кај сите пациентки е направено тестирање за HPV DNA со типизирање, цитолошко тестирање (LB), p16/Ki-67 двојното цитолошко боење како и биопсија со ендоцервикална киретажа за хистолошка верификација. Во анализата се вклучени само пациентките кај кои на скринингот е докажан високоризичен ХПВ со присутна или отсутна цитолошки докажана лезија.

Студијата се спроведе на Универзитетската Клиника за Гинекологија и Акушерство (УГАК) во период од две години (2024, 2025). Сите цитолошки наоди (LB) и имуноцитохемиски боења за p16/Ki-67 се изработени во Цитолошката лабораторија на УГАК, додека пак хистопатолошката анализа на биоптичните материјали е изработена на Институтот за Патологија, Медицински факултет, Скопје и Универзитетската клиника за Радиотерапија и Онкологија, Оддел за цитологија и хистопатологија.

Критериуми за партиципација во клиничкото истражување се:

Инклузиони критериуми:

1. Пациентки на возраст од 18 до 80 години
2. Пациентки со цитолошки докажана сквамозна интраепителна лезија од низок и висок градус кај кои на HPV DNA тестирањето е докажан HPV тип од висок ризик.
3. Пациентки со позитивен наод на типизација за HR-HPV DNA, но со уреден цитолошки наод.
4. Пациентки кои се достапни за следење во сите фази од истражувањето.
5. Пациентки кои ќе се согласат да учествуваат во истражувањето.

Ексклузиони критериуми:

1. Пациентките со HPV тип од низок ризик,

2. Пациентки кај кои при клинички преглед ќе се утврди инвазивен карцином на грлото на матката независно од цитолошкиот наод.
3. Пациентки кај кои нема да биде правена биопсија на грлото на матката.

Пациентките се поделени во четири групи:

1. Пациентки позитивни на тестирањето за HR-HPV DNA (HPV16 и HPV18) а со негативен наод на цитолошкото тестирање.
2. Пациентки позитивни на тестирањето за HR-HPV DNA (останати типови) а со негативен наод на цитолошкото тестирање.
3. Пациентки позитивни на тестирањето за HR-HPV DNA со позитивен цитолошки наод кој одговара на LSIL.
4. Пациентки позитивни на тестирањето за HR-HPV DNA со позитивен цитолошки наод кој одговара на HSIL.

Кај сите групи на пациентки е направено p16/Ki-67 двојното цитолошко боење и е направена корелација помеѓу групите на наодите и хистолошкиот наод.

При анализата, кај дел од пациентките кај кои е завршена хистолошката верификација е направено имуноцитохемиско боење за p16/Ki67 на зачуваните фиксирани материјали од цитолошката анализа LB (ретроспективната подгрупа 40), додека пак кај останатиот дел од пациентките, имуноцитохемиските боења заедно со цитолошкиот наод се направени веднаш по добивањето на наодот од ХПВ типизацијата, по што следеше биопсија за хистопатолошка проверка на интраепителијалната лезија (проспективна подгрупа).

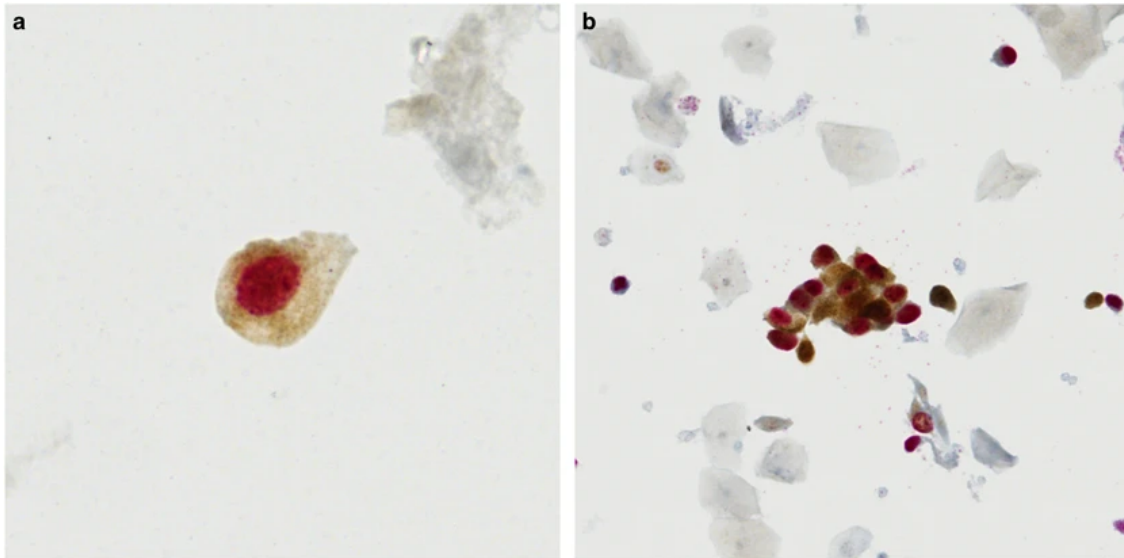
Податоци за пациентките се колекционирани со стандарден прашалник кој вклучува анамнеза со демографски податоци (возраст, образование, вакцинален статус, пушење), и гинеколошка историја како инфективни гинеколошки заболувања, број на породувања, абортуси итн. Од медицинската документација на пациентките ќе се земаат податоци поврзани со претходните цитолошки наоди (перзистентни наоди за интраепителни лезии од низок градус, перзистентно позитивни ХПВ типизации од било кој ХПВ тип и др.)

МЕТОДИ:

LBC (Liquid based cytology): Во истражувањето е користена Liquid based cytology, LBC, која претставува алтернатива на конвенционалните PAP тестови. Примерокот се добива со помош на четка или комбинација од четка и шпатула кои потоа се ставаат и плакнат во течен медиум. Матријалот се остава во медиумот 15 до 20 минути и потоа се става во апарат кој е целосно автоматизиран за центрифугирање и поставување на клетките на предметно стакло. Предметното стакло се вади од апаратот и се фиксира во 96% алкохол. По фиксирањето следува автоматизиран процес на бојење.

Цервикалните брисеви ќе се класифицираат според системот на Bethesda ревидирана класификација од 2014 година.

P16/Ki67 двојното цитолошко бојење: Комплетот за цитологија CINtec® PLUS е квалитативен имуноцитохемиски метод кој се користи за откривање на клетки со неопластична трансформација, покажувајќи позитивност за протеините, антитела за p16 и Ki67. Откривањето на сигналот се случува со два различни хомогени, конверзија на 3,3'-диаминобензидин (DAB) хомоген посредувана од пероксидаза и конверзија на брз црвен хомоген посредувана од алкална фосфатаза, што резултира со кафеава и црвена боја на p16 и Ki-67 антигенските места, соодветно. Присуството на најмалку една цервикална епителна клетка со кафеаво означена цитоплазма и црвено-означено јадро е показател за позитивен резултат од тестот.



Слика 4. Пример за p16/Ki-67 двојно бојење во цервикална цитологија (a) Единечна dual-stain позитивна клетка, Се забележува една цервикална епителна клетка со: црвено нуклеарно обојавање (Ki-67) кафеаво цитоплазматско обојавање (p16) Ова укажува на ко-експресија на двата маркери во истата клетка, што е показател за HPV-индуцирана клеточна дерегулација.

(b) Група на dual-stain позитивни клетки. Повеќе клетки во истото видно поле покажуваат истовремена: црвена нуклеарна експресија (Ki-67) кафеава цитоплазматска експресија (p16). Случајот се смета за dual-stain позитивен доколку една или повеќе цервикални епителни клетки покажуваат истовремено: Морфолошкиот изглед на клетките не е пресуден – доволна е присутноста на ко-експресија во иста клетка за тестот да се интерпретира како позитивен [74].

HPV DNA тестирање/ Real-time multiplex PCR assays for HPV

Примероците за ХПВ-типизација се зема со брис стапче и cytobrush четкичка. Стапчето и четкичката, се до постапката за ДНК-екстракција, се чуваа во соодветен медиум - PBS (Phosphate buffered saline), во стерилни епрувети на температура од 2 – 8°C. Од земените цервикални брисеви се изведува екстракција на ДНК со употреба на комерцијален сет за урогенитални примероци кој е дизајниран за автоматска екстракција на нуклеински киселини од сексуално преносливи патогени, од вагинални брисеви, урина и сперма.

На примероците од ДНК се изведува ХПВ-амплификација во вистинско време (Real-time PCR) со комерцијални китови. Тестот е мултиплекс real-time PCR assay кој овозможува симултана амплификација, детекција и диференцијација на

таргет ДНК на 19 високо ризични ХПВ типови – hr HPV (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) и 9 ниско ризични ХПВ типови – lr HPV (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) како и внатрешна контрола.

Студијата беше одобрена од етичкиот комитет а сите пациентки потпишаа прашалник за информирана согласност за учество во истражувањето.

СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА ПОДАТОЦИ

Статистичка анализа на податоците беше направена во статистичкиот софтвер SPSS (вер. 25.0; IBM, SPSS, USA). Kolmogorov-Smirnov тест и Shapiro Wilk's test беа користени за тестирање на нормалноста на дистрибуцијата на податоците.

Категориските (атрибутивни) варијабли се прикажани со апсолутни и релативни броеви. Нумеричките (квантитативни) варијабли се прикажани со просек, стандардна девијација, минимални и максимални вредности.

За споредување на категориските варијабли беа користени Fisher exact test и Chi-square test, за споредување на квантитативните варијабли, во зависност од дистрибуцијата на податоците беа користени параметарски тестови за независни примероци (Student t-test и Analysis of Variance).

Разликата меѓу резултатите од користените маркери беше тестирана со McNemar Chi square тестот.

ROC анализа со пресметување на плоштина под ROC кривата (AUC) беше користен за да се одреди дискриминаторската способност на анализираните маркери во предикција на високоризични лезии на грлото на матката (CIN 2+).

Дијагностичките перформанси на користените маркери беа одредени со пресметување на сензитивност, специфичност, позитивна и негативна предиктивна вредност.

Статистичката сигнификантност беше дефинирана на ниво на $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

Во истражувањето партиципираа 145 испитанички во истражувањето кое се спроведе на Универзитетската Клиника за Гинекологија и Акушерство во период од 2024 до 2025 година.

Возраста на пациентките се движеше во ранг 17-79 години, просечната возраст беше 38.5 ± 11.8 години. На возраст до 40 години беа 86 (59.3%) пациентки.(табела 1)

Етничката структура ја сочинуваа 136 (93.79%) Македонки, 7 (4.83%) Албанки и 2 (1.38%) пациентки од Турска националност.(табела 1)

Пушачи беа 38 (26.21%) пациентки. (табела 1)

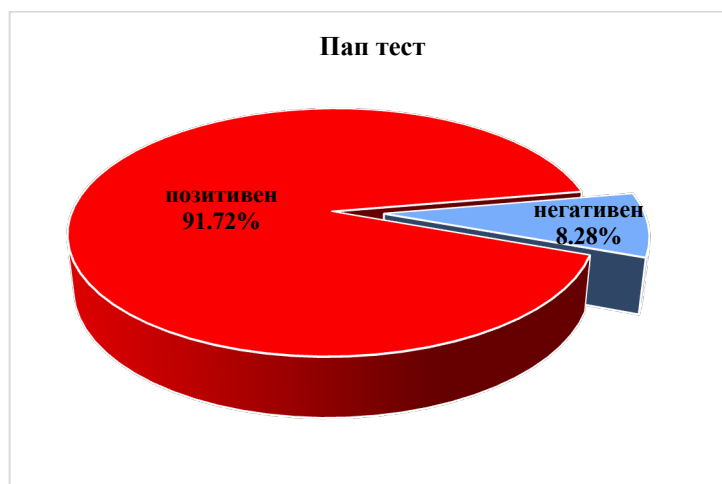
Табела 1. Карактеристики на пациентките

варијабла	n (%)	
Возраст (години) (mean+SD) (min – max)	38.5±11.8 min/max 17-79	
Возраст	<40	86 (59.31)
	>40	59 (40.69)
националност	македонка	136 (93.79)
	албанка	7 (4.83)
	турчинка	2 (1.38)
пушачи	да	38 (26.21)
	не	107 (73.79)

Кај 133 (91.72%) пациентки беше добиен позитивен наод од цитологијата.
(табела 2, слика 1)

Табела 2. Дистрибуција на пациентките во однос на цитолошките наоди

Пап тест	n (%)
позитивен	133 (91.72)
негативен	12 (8.28)
вкупно	145

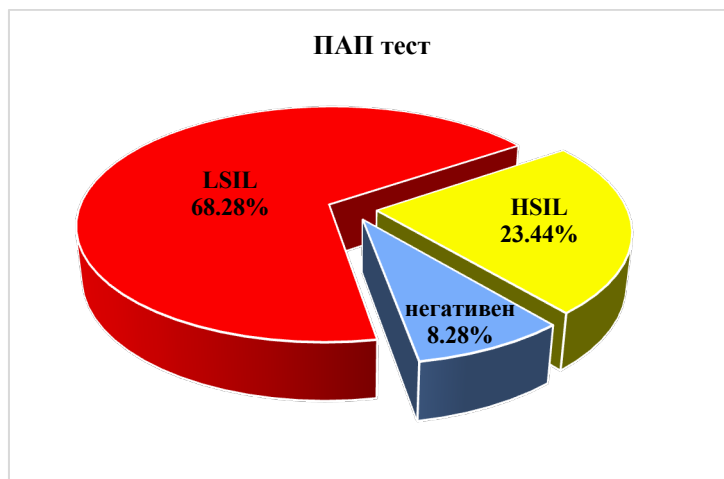


Слика 1. Графички приказ на дистрибуција на пациентките во однос на цитологијата

Дистрибуцијата на позитивните наоди од цитологијата презентира 99 (68.26%) преканцерозни лезии на грлото на матката од групата LSIL, 34 (23.44%) од групата HSIL. (табела 3, слика 2)

Табела 3. Дистрибуција на пациентките во однос на негативни наоди, нискоризични и визокоризични наоди од цитологија

ПАП тест	n (%)
негативен	12 (8.28)
LSIL	99 (68.28)
HSIL	34 (23.44)
вкупно	145

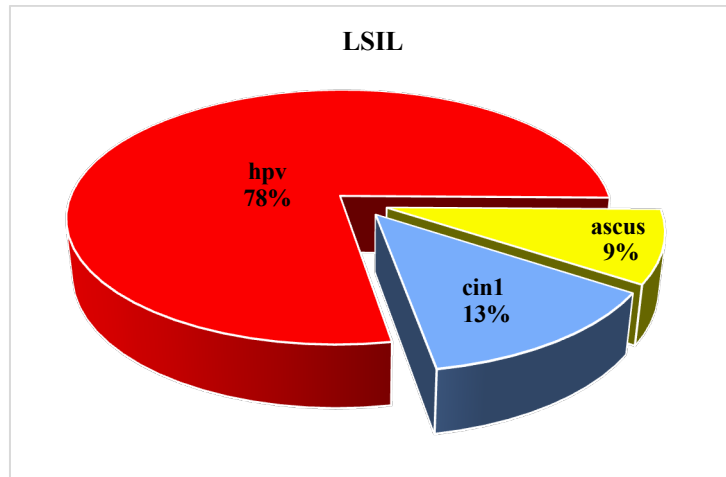


Слика 2. Графички приказ на дистрибуција на негативни наоди, нискоризични и вискоризични наоди од цитологија

Во групата пациентки со LSIL лезии, 78% имаа само HPV cervicitis, 9% имаа и лезија од тип от , ASC-US 13% имаа CIN1. (табела 4, слика 3)

Табела 4. Дистрибуција на пациентките со позитивна цитологија во однос на *LSIL* лезии

LSIL	n (%)
HPV	78 (78)
ASC-US	9 (9)
CIN1	13 (13)
вкупно	100

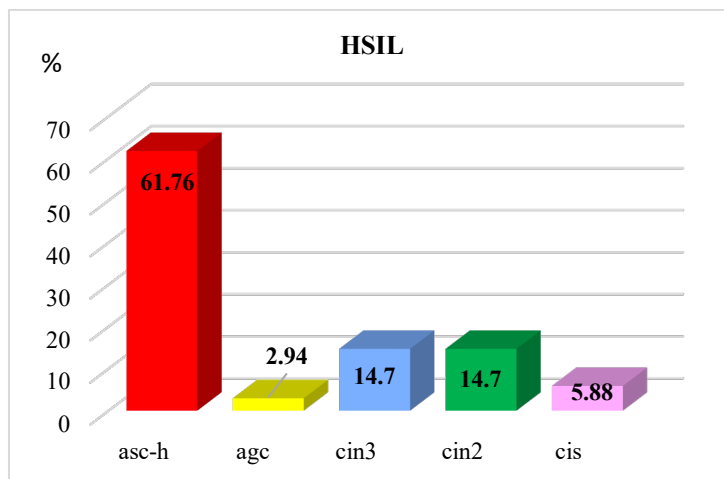


Слика 3. Графички приказ на дистрибуција на LSIL лезии кај пациентки со позитивна цитологија

Во групата пациентки со HSIL лезии, 21 (61.76%) имаа лезија од типот ASC-H, 1 (2.94 %) имаа AGC преканцерозна лезија, 5 (14.71 %) пациентки имаа CIN2 и CIN3, поединечно, кај 2 (5.88 %) пациентки цитологија покажа постоење на CIS (carcinoma in situ). (табела 5, слика 4)

Табела 5. Дистрибуција на пациентките со позитивна цитологија во однос на HSIL лезии

HSIL	n (%)
ASC-H	21 (61.76)
AGC	1 (2.94)
CIN 3	5 (14.7)
CIN 2	5 (14.7)
CIS	2 (5.88)
вкупно	34

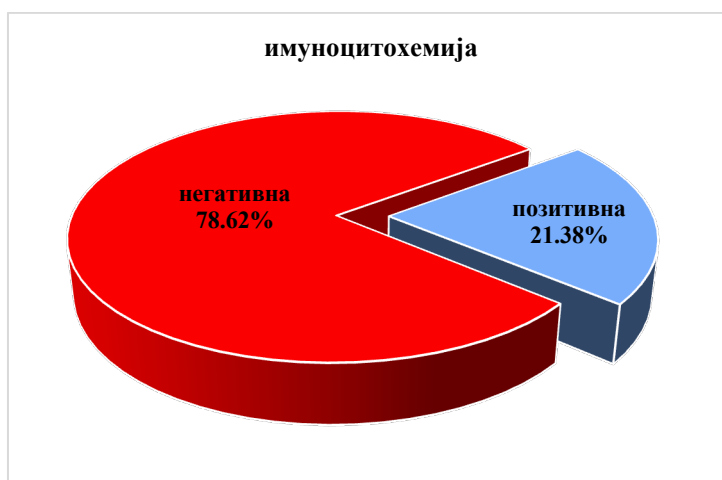


Слика 4. Графички приказ на дистрибуција на HSIL лезии кај пациентки со позитивна цитологија

Кај 31 (21.38%) пациентки имуноцитохемијата беше позитивна, односно p16/Ki67 двојното цитолошко боење покажа позитивен резултат. (табела 6, слика 5)

Табела 6. Дистрибуција на пациентките во однос на имуноцитохемиските наоди

Имуноцитохемија p16/Ki67 dual staining	n (%)
негативна	114 (78.62)
позитивна	31 (21.38)
вкупно	145

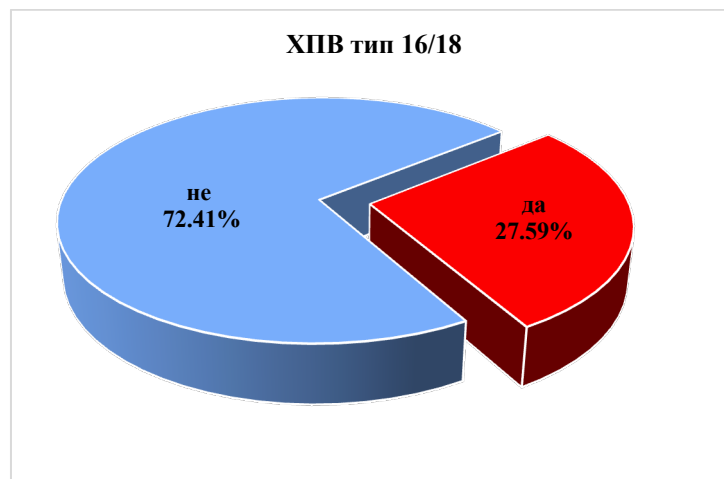


Слика 5. Графички приказ на дистрибуција на пациентките во однос на имуноцитохемија

ХПВ типизацијата кај 40 (27.59%) пациентки детектираше присуство на тип 16/18 хуман папилома вирус. (табела 7, слика 6)

Табела 7. Дистрибуција на пациентките во однос на ХПВ типизација за тип 16/18

ХПВ тип 16/18	n (%)
не	105 (72.41)
да	40 (27.59)
вкупно	145



Слика 6. Графички приказ на дистрибуција на ХПВ 16/18 позитивни/негативни пациентки

Во оваа кохорта на пациентки со ХПВ, типот 16 имаше највисок преваленца имаа типовите 51,52,56,58,59 (40%), следено со инфекција со тип 16(21.38%). (табела 8)

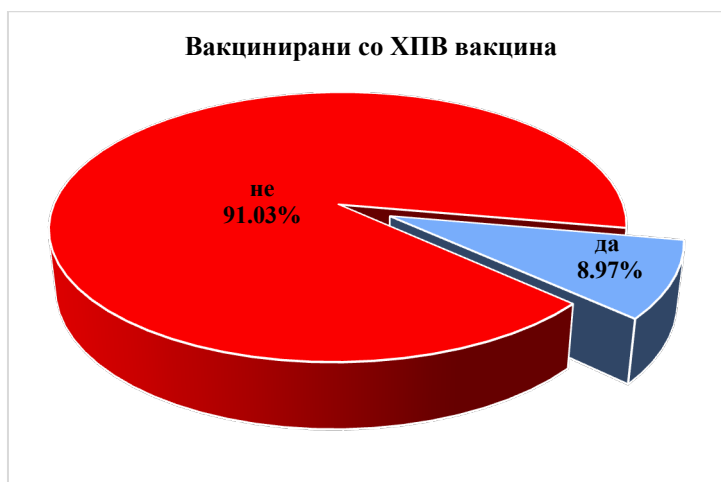
Табела 8. Дистрибуција на пациентките во однос на најчестите типови ХПВ

ХПВ	n (%)
ХПВ 16	31 (21.38)
ХПВ 18	12 (8.28)
ХПВ 31	21 (14.48)
ХПВ 33	6 (4.14)
ХПВ 35,39,45	16 (11.03)
ХПВ 51,52,56,58,59	58 (40)
ХПВ 53 можно канцероген	14 (9.65)

Вакцинирани со ХПВ вакцина беа 13 (8.96%) пациентки. (табела 9, слика 7)

Табела 9. Вакцинален статус кај пациентките

Вакцинирани со ХПВ вакцина	n (%)
да	13 (8.97)
не	132 (91.03)



Слика 7. Графички приказ на дистрибуција на вакцинирани/невакцинирани пациентки

Во табела 10 прикажана е дистрибуцијата на пациентките во однос на наодот од биопсијата со ендоцервикална киретажа.

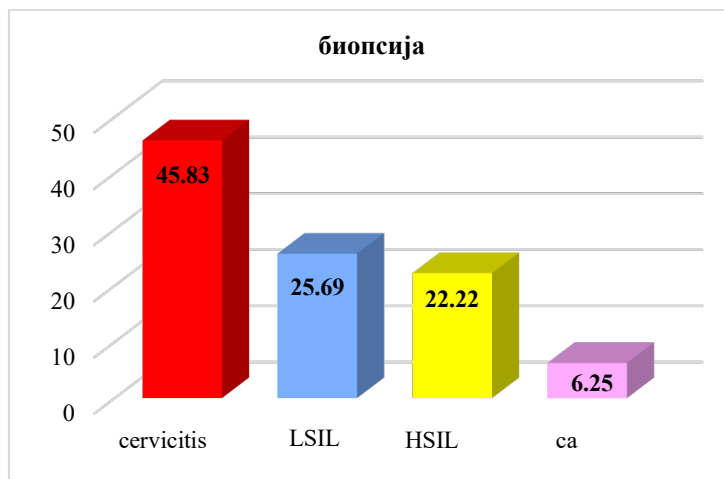
Табела 10. Дистрибуција на пациентките во однос на хистопатолошките резултати

биопсија	n (%)
HSIL mediocris	13 (89.96)
HSIL ca in situ	6 (4.14)
LSIL levis	36 (24.83)
Cervicitis	66 (45.52)
HSIL gravis	20 (13.79)
Ca endometrii	1 (0.69)
Ca planocelulare invasivum	1 (0.69)
ne e bioptirana gravidna	1 (0.69)
Adeno ca cervicis uteri	1 (0.69)
вкупно	145

Хистолошките наоди од биопсија кај 66 (45.83%) пациентки презентираат присуство на cervicitis, кај 37 (25.69%) интраепителна лезија од низок степен, кај 32 (22.22%) интраепителна лезија од висок градус, кај 9 (6.25%) пациентки малигна промена на грлото на матката. (табела 11, слика 8)

Табела 11. Дистрибуција на пациентки со наод на cervicitis, LSIL и HSIL од биопсија

биопсија	n (%)
cervicitis	66 (45.83)
LSIL	37 (25.69)
HSIL	32 (22.22)
ca	9 (6.25)
вкупно	144

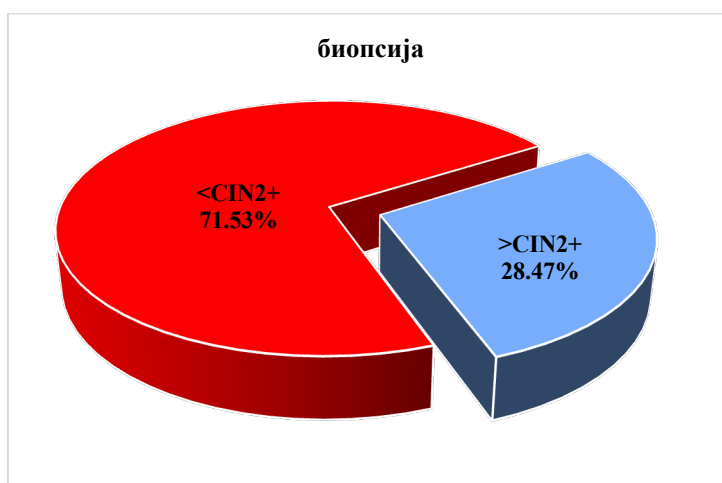


Слика 8. Графички приказ на дистрибуција на пациентки со наод на cervicitis, LSIL и HSIL од биопсија

Хистолошки верифицирана интраепителна лезија од висок градус (CIN2+) беше детектирана кај 41 (28.47%) пациентки. (табела 12, слика 9)

Табела 12. Дистрибуција на пациентките со интраепителна лезија од низок/висок степен од биопсија

биопсија	n (%)
<CIN2+	103 (71.53)
>CIN2+	41 (28.47)
вкупно	144

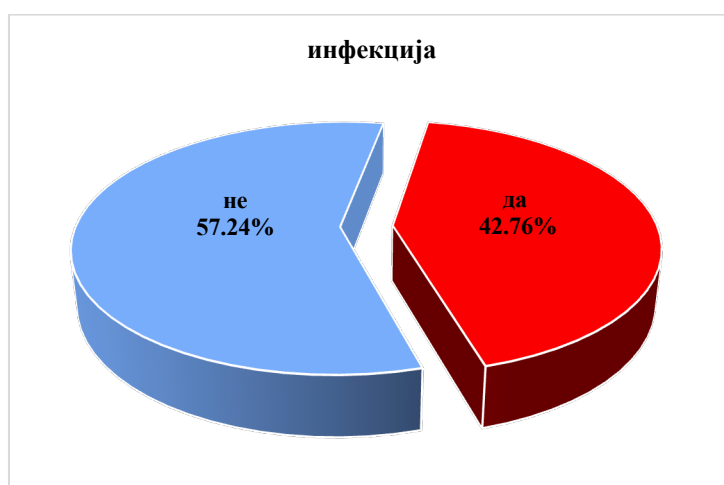


Слика 9. Графички приказ на дистрибуција на нискоризични и високоризични интраепителни лезии

Кај 62 (42.76%) пациентки беше докажана вагинална инфекција.(табела 13, слика 10).

Табела 13. Дистрибуција на пациентките со/без вагинална инфекција

инфекција	n (%)
да	62 (42.76)
не	83 (57.24)
вкупно	144



Слика 10. Графички приказ на дистрибуција на пациентки со/без вагинална инфекција

Најчесто изолираните причинители кај пациентките се прикажани во табела 14.

Табела 14. Дистрибуција на пациентките во однос на резултатите од цервикален брис

причинител	n (%)
candida	21 (14.48)
gardnerela	23 (15.86)
kokoidni	11 (7.59)
chlamidia	11 (7.59)
ureoplazma	9 (6.21)

Во табела 15 прикажана е дистрибуцијата на хистопатолошките наоди кај пациентките помлади и постари од 40 години, и истата несигнификантно се разликуваше меѓу двете групи ($p=0.528$). (табела 14).

Во двете возрастни групи најчест беше наодот на cervicitis, почесто кај пациентките помлади од 40 години (50.59% vs 38.98%), следено со LSIL лезии (24.71% vs 25.42%).

Табела 15. Дистрибуција на хистопатолошките наоди кај пациентките помлади и постари од 40 години

биопсија	возрасни групи (години)			p-value
	n	<40 n (%)	≥40 n (%)	
HSIL mediocris	13	7 (8.24)	6 (10.17)	Fisher's exact p=0.528
HSIL ca in situ	6	2 (2.35)	4 (6.78)	
LSIL levis	36	21 (24.71)	15 (25.42)	
cervicitis	66	43 (50.59)	23 (38.98)	
HSIL gravis	20	11 (12.94)	9 (15.25)	
Ca endometrii	1	1 (1.18)	0	
ca planocelulare invasivum	1	0	1 (1.69)	
Adeno ca cervicis uteri	1	0	1 (1.69)	
вкупно	144	85	59	

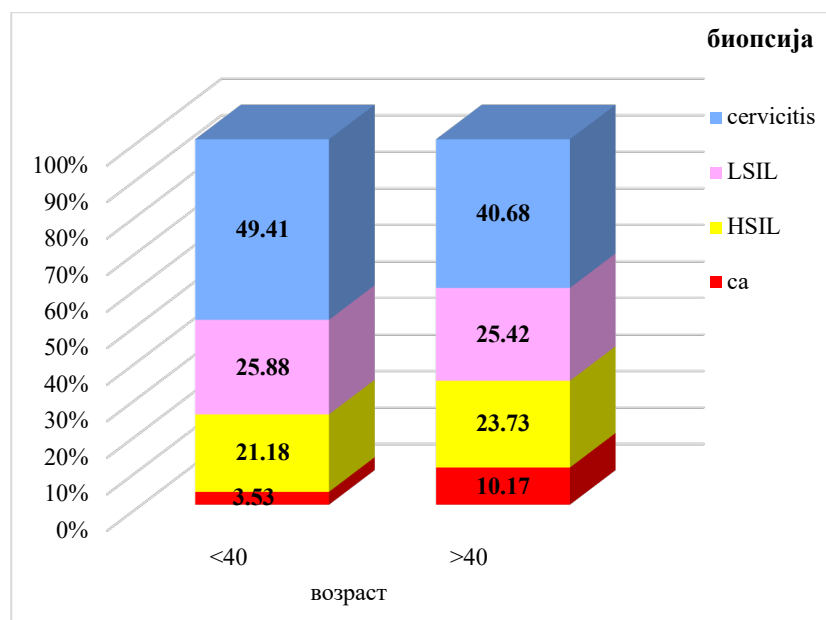
Во табела 16 и слика 11 прикажана е дистрибуцијата на хистолошките наоди добиени со биопсија кај пациентките помлади и постари од 40 години.

Кај пациентките помлади од 40 години почесто беше дијагностициран цервицитис (49.41% vs 40.68%) и HSIL лезии (21.18% vs 23.73%), малигна лезија почесто имаа пациентките постари од 40 години (10.17% vs 3.53%), додека процентуалната застапеност на пациентки со LSIL лезии беше идентична во двете возрастни групи (25.88% vs 25.42%, соодветно во помладата и постара возрастна група).

Дистрибуцијата на пациентки со цервицитис, LSIL и HSIL меѓу двете возрастни групи не беше сигнификантно различна ($p=0.384$).

Табела 16. Дистрибуција на хистопатолошките наоди кај пациентките помлади и постари од 40 години

биопсија	возрасни групи (години)			p-value
	n	<40 n (%)	≥40 n (%)	
cervicitis	66	42 (49.41)	24 (40.68)	Fisher's exact p=0.384
LSIL	37	22 (25.88)	15 (25.42)	
HSIL	32	18 (21.18)	14 (23.73)	
ca	9	3 (3.53)	6 (10.17)	
вкупно	144	85	59	



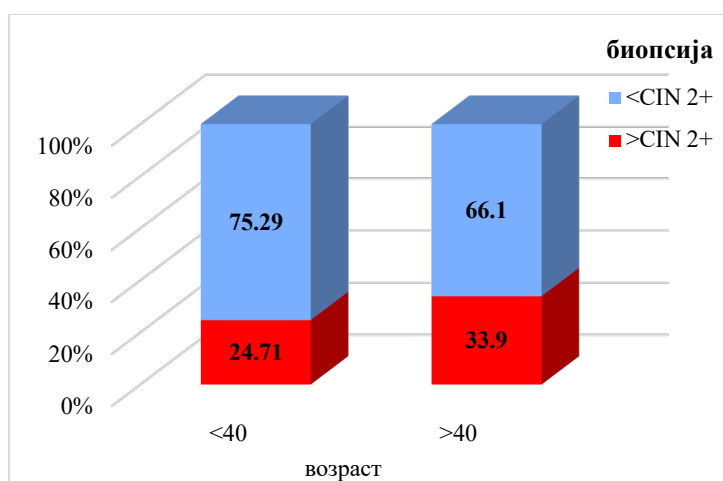
Слика 11. Графички приказ на дистрибуција на хистопатолошките наоди кај пациентките помлади и постари од 40 години

CIN2+ незначајно почесто беше дијагностицирана кај пациентките постари од 40 години (33.9% vs 24.71%), $p=0.229$. (табела 17, слика 12)

Табела 17. Дистрибуција на интраепителна лезија од низок/висок степен кај пациентките помлади и постари од 40 години

биопсија	возрасни групи (години)			p-value
	n	<40 n (%)	≥40 n (%)	
<CIN 2+	103	64 (75.29)	39 (66.1)	$X^2=1.445$ $p=0.229$
>CIN 2+	41	21 (24.71)	20 (33.9)	
вкупно	144	85	59	

X^2 (Chi-square test)



Слика 12. Графички приказ на дистрибуција на интраепителна лезија од низок/висок степен кај пациентките помлади и постари од 40 години

Просечната возраст на пациентките со цервицитис беше 36.5 ± 10.8 години, на пациентките со LSIL лезија 38.8 ± 12.4 години, на пациентките со HSIL лезија 40.3 ± 11.6 години, пациентките со малигна лезија беа со просечна возраст од 48.0 ± 12.7 години, со вкупна статистичка сигнификантна разлика, за $p=0.036$). Post-hoc анализата за меѓугрупни компарации покажа дека оваа вкупна сигнификантност се должи на значајно постари пациентки со малигна лезија споредено со пациентките со цервицитис ($p=0.0266$). (табела 18,18а, слика 13)

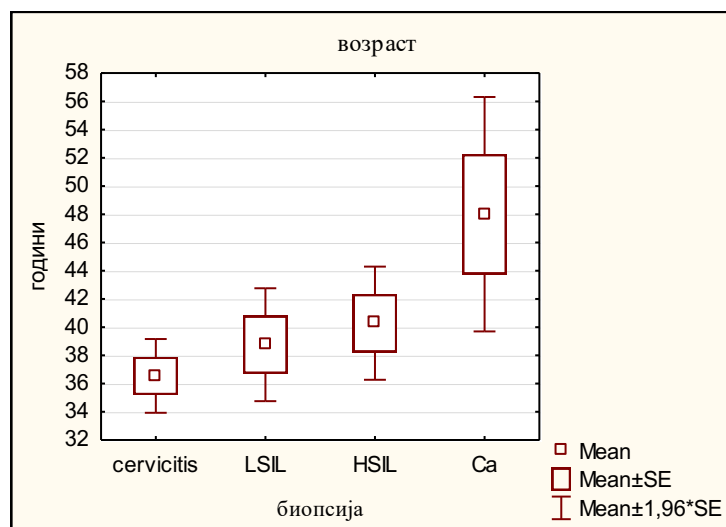
Табела 18. Возраст на пациентките во зависност од хистопатолошкиот наод

биопсија	возраст (години)		
	n	mean ± SD	min- max
cervicitis	66	36.54 ± 10.8	19 – 63
LSIL	37	38.76 ± 12.4	21 – 64
HSIL	32	40.28 ± 11.6	20 – 79
ca	9	48.0 ± 12.7	33 – 70

Табела 18а. Тестирани разлики во возраста во зависност од хистопатолошкиот наод

F=2.92 p=0.036 Tukey HSD test F=2.92 p=0.03626			
биопсија	LSIL	HSIL	ca
cervicitis	0.787	0.435	0.0266
LSIL		0.947	0.135
HSIL			0.286

F(Analysis of Variance)



Слика 13. Графички приказ на просечната возраст на пациентките во зависност од хистопатолошкиот наод

Просечната возраст на пациентките со хистолошки верифицирана интраепителна лезија од висок градус (CIN2+) изнесуваше 42.0±12.1 години, просечната возраст на пациентките со <CIN 2+ лезија беше 37.4±11.4 години,

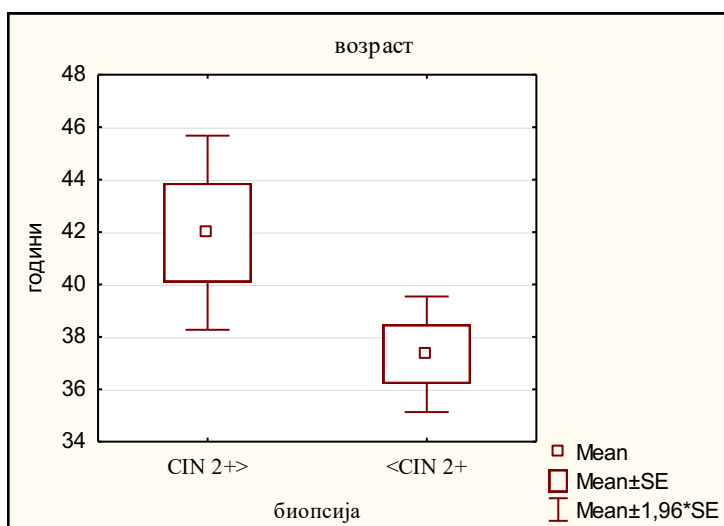
разликата од просечни 4.6 години беше сигнификантна, за $p=0.032$. (табела 19, слика 14)

Табела 19. Возраст на пациентките со <CIN 2+ и >CIN 2+ хистопатолошки наод

биопсија	возраст (години)			p-level
	n	mean \pm SD	min- max	
<CIN 2+	103	37.34 \pm 11.4	19 – 64	t=2.16 *p=0.0323
>CIN 2+	41	41.98 \pm 12.1	20 – 79	

t (Student t-test)

*sig $p<0.05$

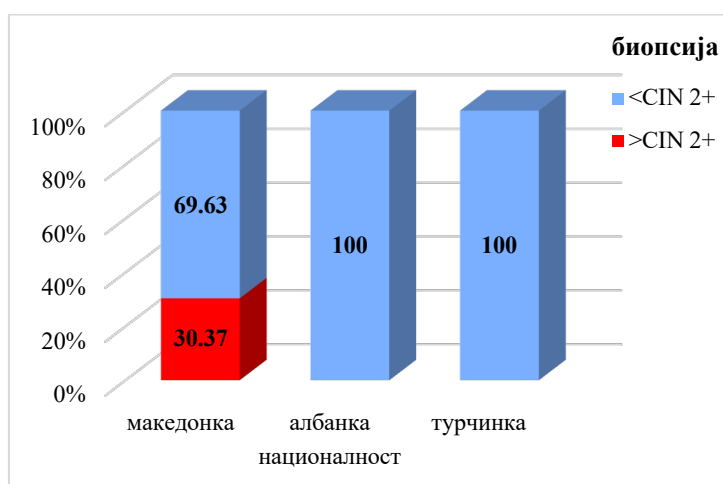


Слика 14. Графички приказ на просечната возраст на пациентките со <CIN 2+ и >CIN 2+

Сите пациентки со CIN 2+ лезија потврдена хистолошки беа Македонки, 69.63% пациентки со македонска националност и сите пациентки со албанска и турска националност имаа <CIN 2+ хистолошки наод. (табела 20, слика 15)

Табела 20. Националност на пациентките со <CIN 2+ и >CIN 2+ хистопатолошки наод

биопсија	националност				p-level
	n	македонка n (%)	албанка n (%)	турчинка n (%)	
<CIN 2+	103	94 (69.63)	7 (100)	2 (100)	Fisher's exactp=0.256
>CIN 2+	41	41 (30.37)	0	0	
вкупно	144	135	7	2	



Слика 15. Графички приказ на дистрибуција на националноста на пациентките со <CIN 2+ и >CIN 2+ хистопатолошки наод

Пушачкиот статус беше сигнификантно асоциран со интраепителна лезија од висок градус (CIN2+), $p=0.0026$. (табела 21)

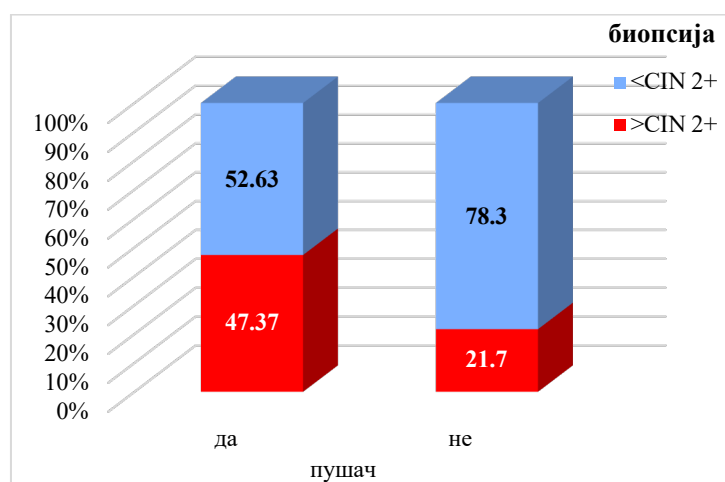
Пушачите значајно почесто од непушачите имаа хистолошки верифицирана интраепителна лезија од висок градус (CIN2+) (47.37% vs 21.7%). (табела 21, слика 16)

Табела 21. Пушачки статус на пациентките со <CIN 2+ и >CIN 2+ хистопатолошки наод

биопсија	пушач			p-value
	n	да n (%)	не n (%)	
<CIN 2+	103	20 (52.63)	83 (78.3)	X ² =9.05 **p=0.0026
>CIN 2+	41	18 (47.37)	23 (21.7)	
вкупно	144	38	106	

X²(Chi-square test)

**sig p<0.01



Слика 16. Графички приказ на дистрибуција на пациентки со <CIN 2+ и >CIN 2+ хистопатолошки наод во зависност од пушачкиот статус

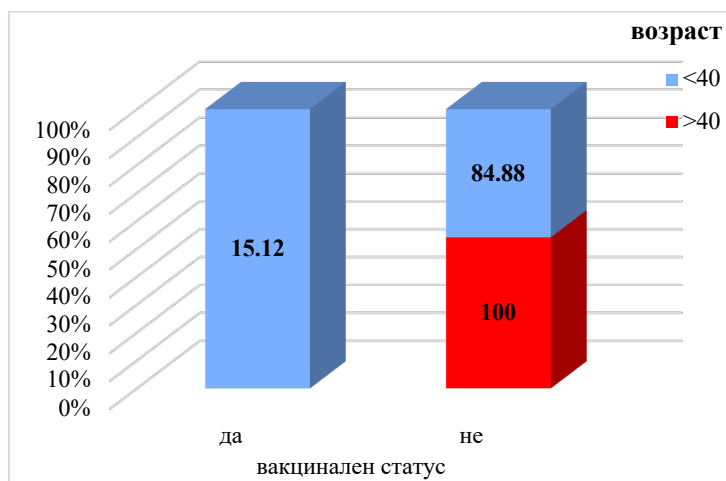
Вакциналниот статус на пациентките беше сигнификантно асоциран со возраста (p=0.0017). Вакцинирани беа 15.3% пациентки помлади од 40 години, ниту една од возрасната група постари од 40 години. (табела 22, слика 17)

Табела 22. Вакцинален статус на пациентките помлади и постари од 40 години

возраст	вакцинален статус			p-value
	n	да n (%)	не n (%)	
<40	86	13 (15.12)	73 (84.88)	X ² =9.79 **p=0.00175
>40	59	0	59 (100)	
вкупно	145	13	132	

X²(Chi-square test)

**sig p<0.01



Слика 17. Графички приказ на дистрибуција на пациентки помлади и постари од 40 години во зависност од вакциналниот статус

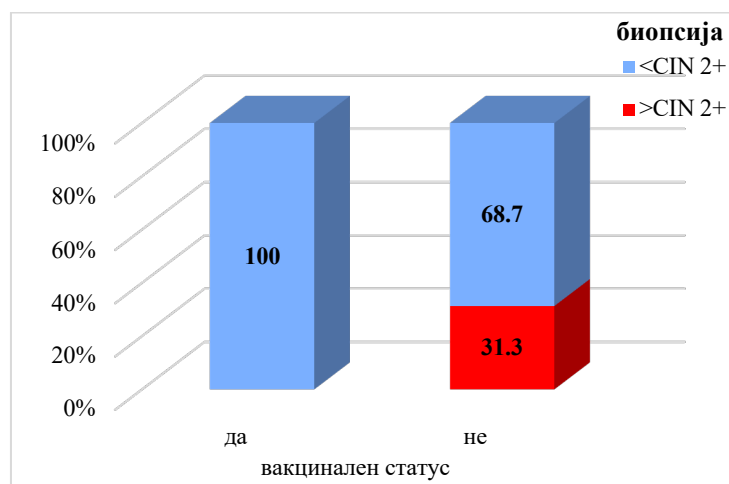
Вакциналниот статус беше значајно асоциран и со степенот на интраепителна лезија, p=0.0198. (табела 23, слика 18)

Невакцинираните значајно почесто од вакцинираните имаа хистолошки верифицирана интраепителна лезија од висок градус (CIN2+) (31.3% vs 0%),).

Табела 23. Вакцинален статус на пациентките со <CIN 2+ и >CIN 2+ хистопатолошки наод

биопсија	вакцинален статус			p-value
	n	да n (%)	не n (%)	
<CIN 2+	103	13 (100)	90 (68.7)	Fisher's exact p=0.0198
>CIN 2+	41	0	41 (31.3)	
вкупно	144	13	132	

*sig p<0.05



Слика 18. Графички приказ на дистрибуција на пациентки со <CIN 2+ и >CIN 2+ хистопатолошки наод во зависност од вакциналниот статус

Вагинална инфекција имаа 40% пациентки без ХПВ инфекција со тип 16/18 и 50% пациентки со ХПВ 16/18, но без сигнификантна разлика (p=0.277).(табела 24)

Табела 24. Зачестеност на инфекција кај пациентки со/без ХПВ 16/18

инфекција	ХПВ 16/18			p-value
	n	да n (%)	не n (%)	
да	62	20 (50)	42 (40)	X ² =1.18 p=0.277
не	83	20 (50)	63 (60)	
вкупно	145	40	105	

X²(Chi-square)

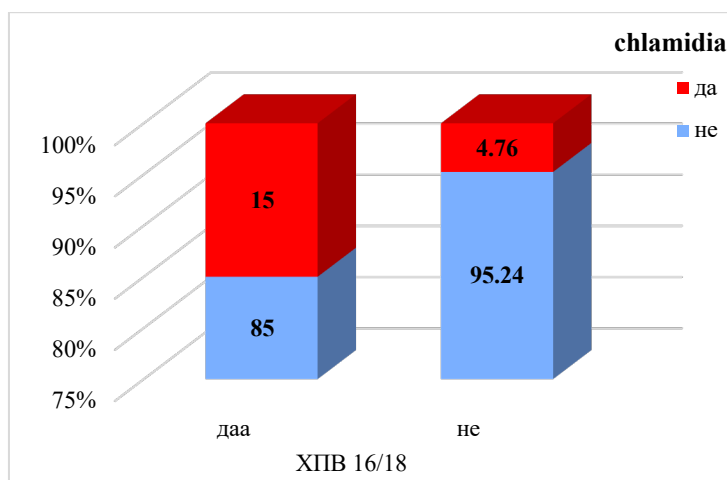
Вагинална инфекција со *Chlamydia trachomatis* сигнификантно почесто беше докажана кај пациентките со ХПВ тип 16/18 (15% vs 4.76%, $p=0.037$). (табела 25, слика 19)

Табела 25. Зачестеност на инфекција со *Chlamydia trachomatis* кај пациентки со/без ХПВ 16/18

chlamidia	ХПВ 16/18			p-value
	n	да n (%)	не n (%)	
да	11	6 (15)	5 (4.76)	$X^2=4.33$ * $p=0.037$
не	134	34 (85)	100 (95.24)	
вкупно	145	40	105	

X^2 (Chi-square)

*sig $p<0.05$



Слика 19. Графички приказ на зачестеност на инфекција со *chlamidia* кај пациентки со/без ХПВ 16/18

Пациентките со ХПВ 16/18 несигнификантно почесто од пациентките без овие ХПВ типови имаа инфекција со *Ureaplasma urealyticum*, (7.5% vs 5.71%, $p=0.71$). (табела 26)

Табела 26. Зачестеност на инфекција со *Ureaplasma urealyticum*, кај пациентки со/без ХПВ 16/18

Ureaplasma urealyticum	ХПВ 16/18			p-value
	n	да n (%)	не n (%)	
да	9	3 (7.5)	6 (5.71)	Fisher's exact p=0.71
не	136	37 (92.5)	99 (94.29)	
вкупно	145	40	105	

Во истражувањето беше користена ROC (receiver-operating characteristic) анализа за да се одреди дискриминаторската способност на анализираните тестови во предикција на високоризични лезии на грлото на матката (CIN 2+).

ROC-кривата прикажува однос помеѓу:

Сензитивност (True Positive Rate – TPR) → процент на правилно откриени болни лица

Специфичност (False Positive Rate – FPR) → процент на здрави лица што погрешно се означени како болни

AUC (Area Under the Curve) е најважниот показател.

AUC = 1.0 → совршен тест

AUC = 0.9–0.99 → одличен

AUC = 0.8–0.89 → добар

AUC = 0.7–0.79 → прифатлив

AUC = 0.5 → тест без дијагностичка вредност (како случаен избор)

Колку е поголема AUC, толку тестот подобро разликува болни од здрави лица.

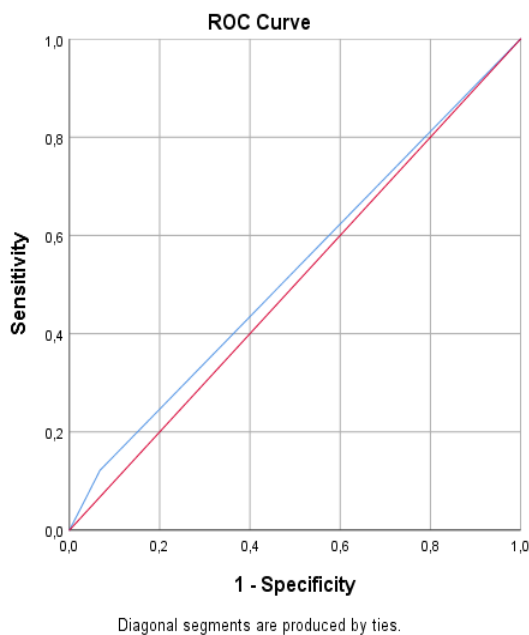
Зошто е важна ROC-кривата?

Овозможува споредба на повеќе дијагностички тестови. Помага во избор на најдобра гранична вредност. Не зависи од преваленцата на болеста. Дава целосна слика за перформансите на тестот

Плоштината под ROC кривата **AUC (Area Under the Curve)** за цитологијата во предикција на >CIN 2+ има вредност од 0.527 (AUC=0.527, CI 95% 0.420-0.634), што укажува дека ПАП тестот е слаб предиктор во разграничување на пациенти со нискоризични и високоризични лезии на грлото на матката. (табела 27, слика 20)

Табела 27. AUC за цитологија во предикција на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

варијабла	AUC	Std. Error ^a	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
цитологија	0.527	0.054	0.614	0.420	0.634



Слика 20. ROC крива за LBC цитологија во предикција на >CIN 2+ лезии

Во табела 28 прикажани се плоштината под ROC кривите AUC (Area Under the Curve) за различни типови ХПВ како маркери за предикција на високоризични лезии на грлото на матката.

Плоштината под ROC кривата AUC (Area Under the Curve) има најголема вредност за истовремено присуство на HPV 16/18, од 0.732 (AUC=0.732, CI 95%

0.634-0.831), што укажува дека HPV 16/18 имаат добра дискриминаторска способност во разграничување на пациенти со нискоризични и високоризични лезии на грлото на матката.

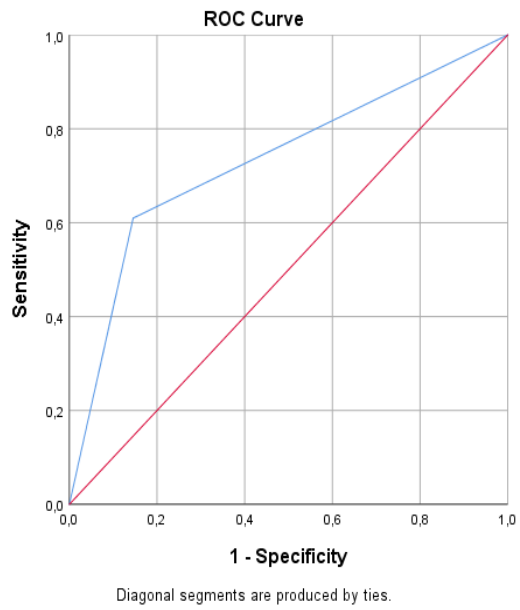
Плоштината под ROC кривата AUC (Area Under the Curve) за присуство на HPV 16, од 0.673 (AUC=0.673, CI 95% 0.568-0.779), што укажува дека HPV 16 имаат доволна дискриминаторска способност во разграничување на пациенти со нискоризични и високоризични лезии на грлото на матката.

Плоштината под ROC кривата AUC (Area Under the Curve) за присуство на HPV 18 и 31, од 0.578 (AUC=0.578, CI 95% 0.469-0.687) и од 0.569 (AUC=0.569, CI 95% 0.461-0.676), соодветно за тип 18 и 31, што укажува дека овие типови имаат слаба дискриминаторска способност во разграничување на пациенти со нискоризични и високоризични лезии на грлото на матката.

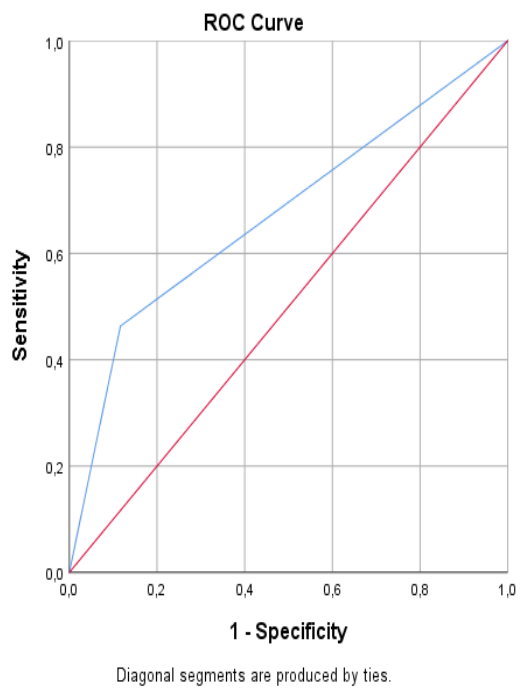
Останатите ХПВ типови согласно плоштината под ROC кривата имаат недоволна дискриминаторска способност во разграничување на пациенти со нискоризични и високоризични лезии на грлото на матката. (табела28, слика 21,21а,21б,21в,21г,21д,21ѓ,21е)

Табела 28. AUC за HPV типизацијата во предикција на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

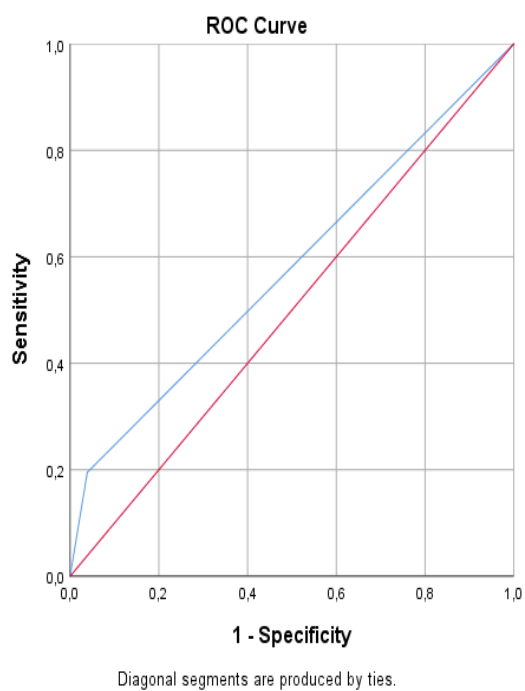
варијабла	AUC	Std. Error ^a	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
HPV 16/18	0.732	0.05	0.000	0.634	0.831
HPV 16	0.673	0.054	0.001	0.568	0.779
HPV 18	0.578	0.056	0.144	0.469	0.687
HPV 31	0.569	0.055	0.2	0.461	0.676
HPV 33	0.488	0.053	0.821	0.384	0.592
HPV 35,39,45	0.491	0.053	0.821	0.386	0.595
HPV 51,52,56,58,59	0.411	0.051	0.096	0.310	0.512
HPV 53	0.483	0.053	0.753	0.380	0.587



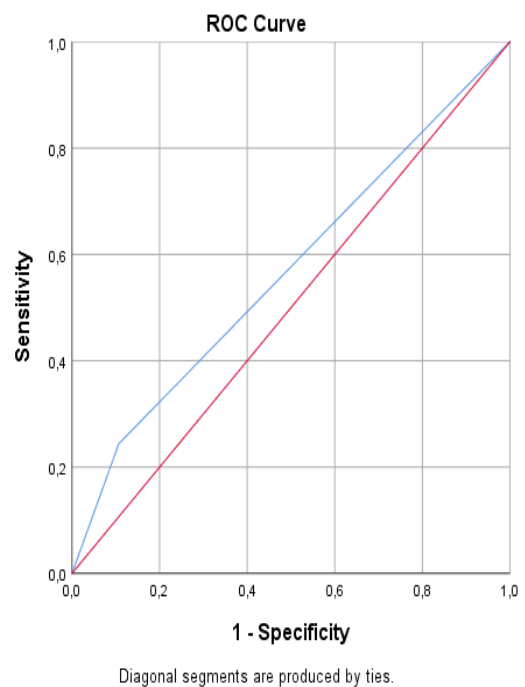
Слика 21. ROC крива за HPV 16/18 во предикција на >CIN 2+ лезии



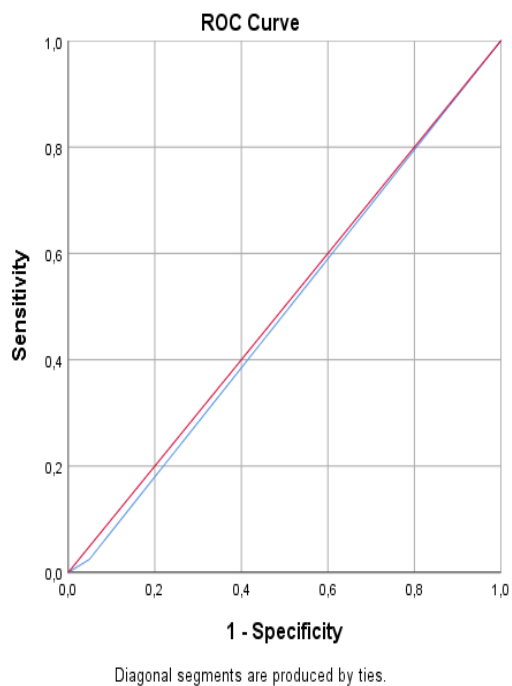
Слика 21а. ROC крива за HPV 16 во предикција на >CIN 2+ лезии



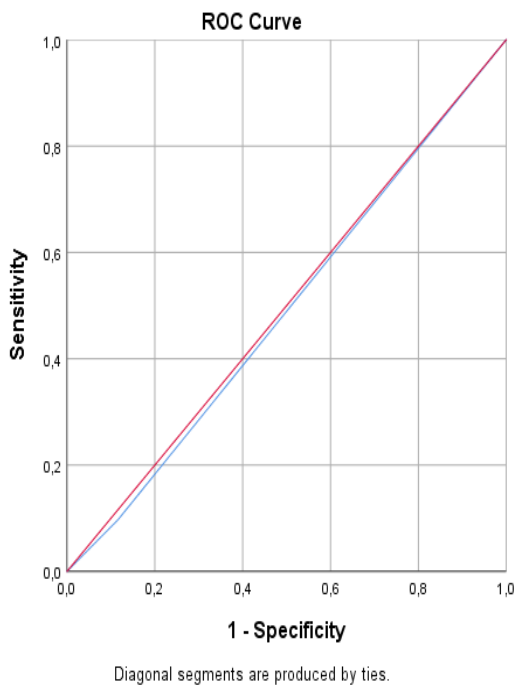
Слика 21б. ROC крива за HPV 18 во предикција на >CIN 2+ лезии



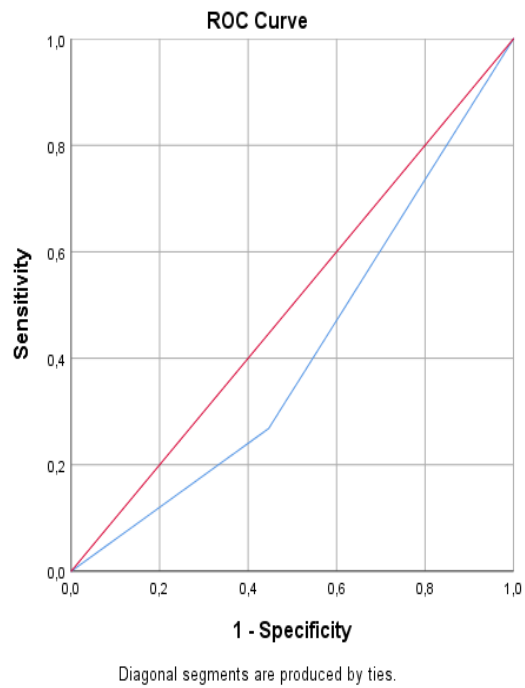
Слика 21в. ROC крива за HPV 31 во предикција на >CIN 2+ лезии



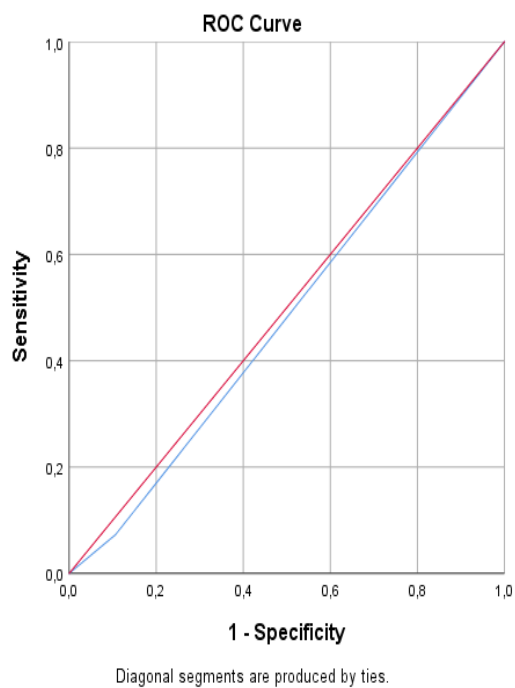
Слика 21г. ROC крива за HPV 33 во предикција на >CIN 2+ лезии



Слика 21д. ROC крива за HPV 35,39,45 во предикција на >CIN 2+ лезии



Слика 21г. ROC крива за HPV 51 и останати во предикција на >CIN 2+ лезии

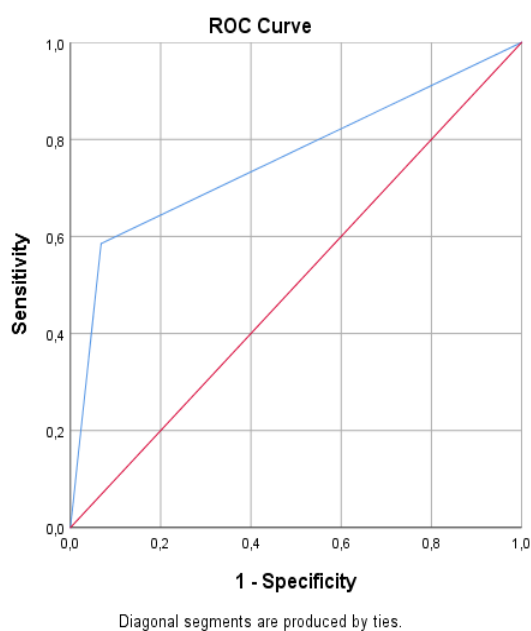


Слика 21е. ROC крива за HPV 53 во предикција на >CIN 2+ лезии

Плоштината под ROC кривата AUC (Area Under the Curve) за имуноцитохемија p16/Ki-67 Dual-Staining во предикција на >CIN 2+ има вредност од 0.759 (AUC=0.759, CI 95% 0.66-0.857), што укажува дека p16/Ki-67 двојното цитолошко боење претставува добар предиктор во разграничување на пациенти со нискоризични и високоризични лезии на грлото на матката. (табела 29, слика 22)

Табела 29. AUC за имуноцитохемија p16/Ki-67 двојното цитолошко боење во предикција на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

варијабла	AUC	Std. Error ^a	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
имуноцитохемија	0.759	0.05	0.000	0.66	0.857

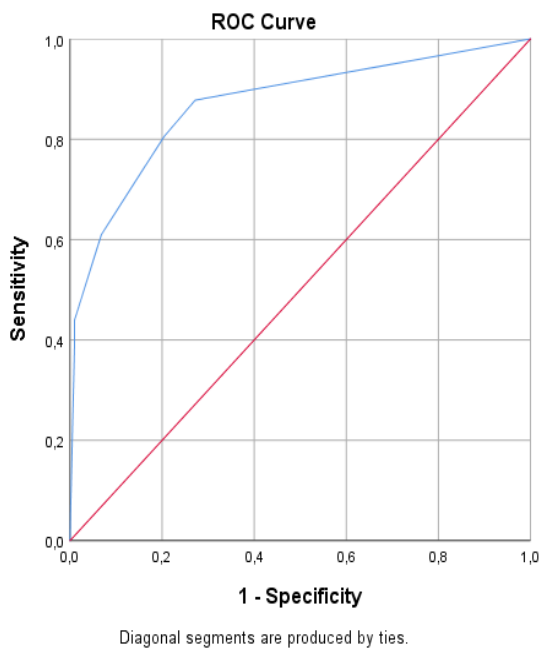


Слика 22. ROC крива за имуноцитохемија во предикција на >CIN 2+ лезии

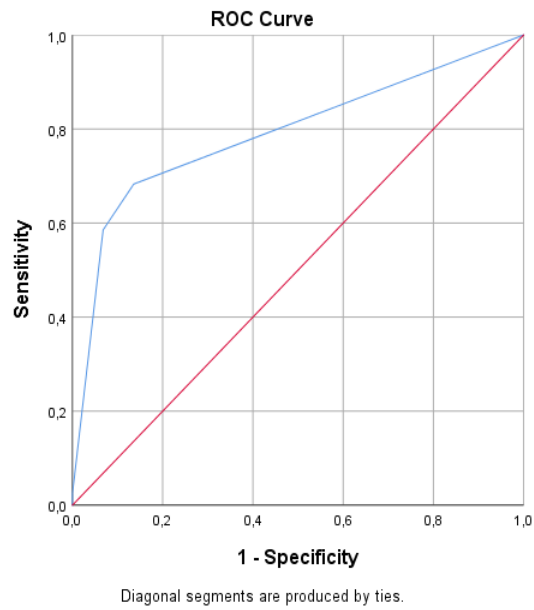
Во табела 30 се прикажани вредностите на AUC за комбинациите на тестови.
(табела 30, слика 23,23а,23б)

Табела 30. AUC за комбинации од цитологија,HPV типизација и имуноцитохемија p16/Ki-67 Dual-Staining во предикција на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

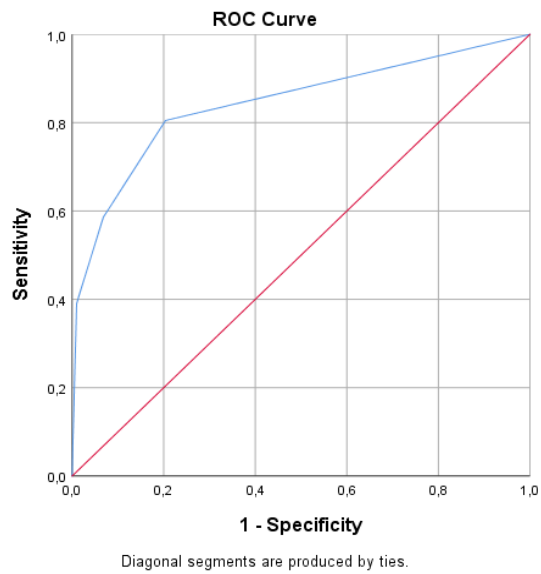
варијабла	AUC	Std. Error ^a	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
цитологија+HPV+имуноцитохемија	0.870	0.036	0.000	0.798	0.941
цитологија+имуноцитохемија	0.791	0.047	0.000	0.698	0.884
HPV+имуноцитохемија	0.843	0.041	0.000	0.762	0.924



Слика 23. ROC крива за цитологија+HPV+имуноцитохемија во предикција на >CIN 2+ лезии



Слика 23а. ROC крива за цитологија+имуноцитохемија p16/Ki-67 Dual-Staining во предикција на >CIN 2+ лезии

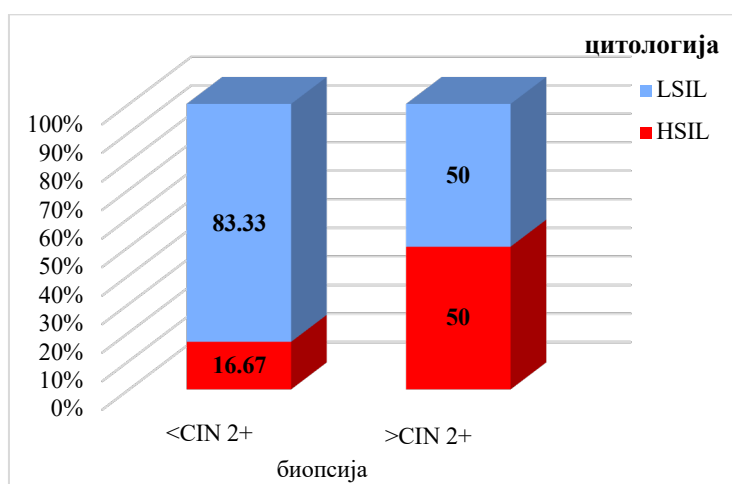


Слика 23б. ROC крива за HPV+имуноцитохемија во предикција на >CIN 2+ лезии

Од 98 негативни наоди за интраепителни високоризични лезии на грлото на матка (>CIN 2+) добиени со цитологија, биопсијата како негативни потврди 80. Од 34 HSIL наоди добиени со цитологија, биопсијата како високоризични потврди 18. (табела 31, слика 24)

Табела 31. Резултати од цитологија наспроти биопсија

цитологија	биопсија		вкупно
	<CIN 2+	>CIN 2+	
LSIL	80	18	98
HSIL	16	18	34
вкупно	96	36	132



Слика 24. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за цитологија наспроти биопсија

Во табела 31а прикажани се дијагностичките перформанси на цитологијата како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

Табела 31а. Валидност на цитологија во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

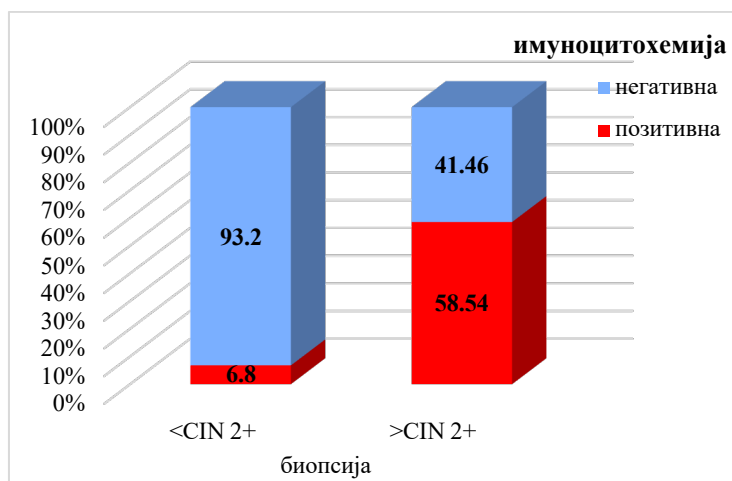
цитологија	Value	95% CI
Sensitivity	50.00%	32.92% to 67.08%
Specificity	83.33%	74.35% to 90.16%
Positive Likelihood Ratio	3.00	1.72 to 5.22
Negative Likelihood Ratio	0.60	0.43 to 0.84
Positive Predictive Value	52.94%	39.27% to 66.19%
Negative Predictive Value	81.63%	76.01% to 86.18%
Accuracy	74.24%	65.91% to 81.46%

Од 113 негативни наоди за интраепителни високоризични лезии на грлото на матка (>CIN 2+) добиени со имуноцитохемија, биопсијата како негативни потврди 96. Од 31 позитивни наоди со имуноцитохемија, 7 потврди и биопсијата.

Разликата во пропорцијата на позитивни наоди потврдени со имуноцитохемија и биопсија не беше сигнификантно различна (0.2153 vs 0.2847, p=0.066). (табела 32, слика 25)

Табела 32. Резултати од имуноцитохемија p16/Ki-67 Dual-Staining наспроти биопсија

имуноцитохемија p16/Ki-67 Dual- Staining	биопсија		вкупно	p-level
	<CIN 2+	>CIN 2+		
негативна	96	17	113	McNemar $X^2=3.37$ p=0.066
позитивна	7	24	31	
вкупно	103	41	144	



Слика 25. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за имуноцитохемија

Во табела 32а прикажани се дијагностичките перформанси на имуноцитохемијата како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

Табела 32а. Валидност на имуноцитохемија p16/Ki-67 Dual-Staining во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

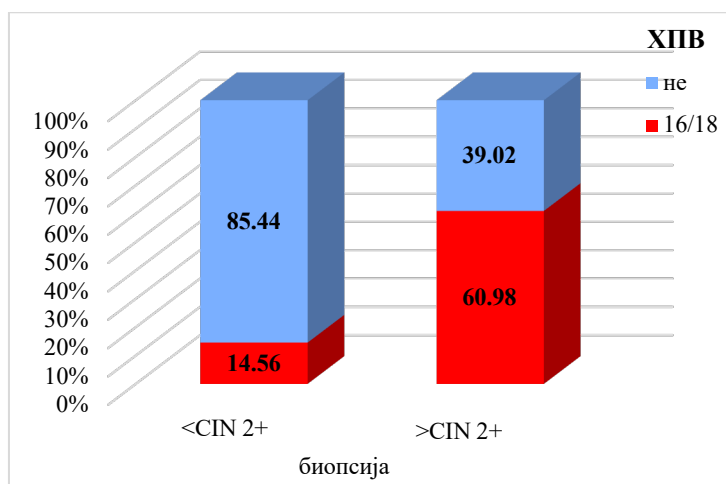
имуноцитохемија	Value	95% CI
Sensitivity	58.54%	42.11% to 73.68%
Specificity	93.20%	86.50% to 97.22%
Positive Likelihood Ratio	8.61	4.03 to 18.42
Negative Likelihood Ratio	0.44	0.31 to 0.64
Positive Predictive Value	77.42%	61.58% to 88.00%
Negative Predictive Value	84.96%	79.64% to 89.08%
Accuracy	83.33%	76.22% to 89.02%

Во групата од 104 пациентки без ХПВ 16/18, биопсијата кај 88 пациентки не потврди високоризична лезија. Во групата од 40 пациентки со ХПВ 16/18, 25 пациентки имаа наод за CIN2+ лезија.

Разликата во пропорцијата на позитивни наоди за HPV 16/18 со типизација и позитивни наоди со биопсија не беше сигнификантно различна (0.2778 vs 0.2847, p=1.0). (табела 29, слика 224)

Табела 33. Резултати од ХПВ типизација за 16/18 наспроти биопсија

ХПВ 16/18	биопсија		вкупно	p-level
	<CIN 2+	>CIN 2+		
не	88	16	104	McNemar $X^2=0.00$ p=1.0
да	15	25	40	
вкупно	103	41	144	



Слика 26. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за ХПВ 16/18 наспроти биопсија

Во табела 33а прикажани се дијагностичките перформанси на ХПВ типизацијата на 16/18 како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

Табела 33а. Валидност на ХПВ 16/18 во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

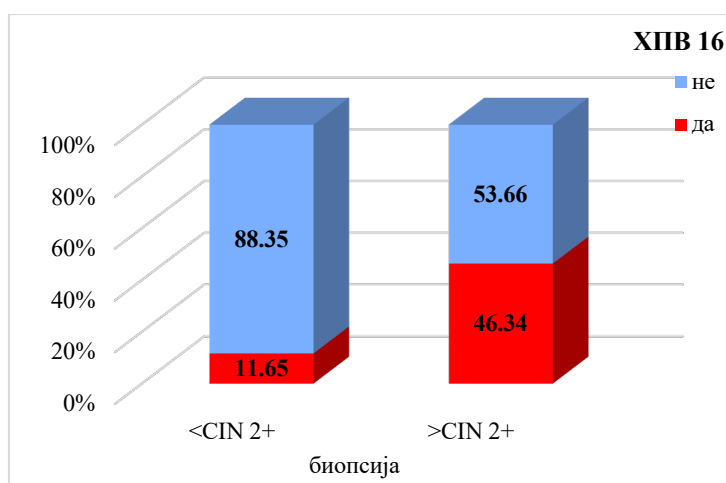
ХПВ 16/18	Value	95% CI
Sensitivity	60.98%	44.50% to 75.80%
Specificity	85.44%	77.12% to 91.61%
Positive Likelihood Ratio	4.19	2.47 to 7.10
Negative Likelihood Ratio	0.46	0.31 to 0.68
Positive Predictive Value	62.50%	49.57% to 73.86%
Negative Predictive Value	84.62%	78.82% to 89.05%
Accuracy	78.47%	70.86% to 84.88%

Во групата од 113 пациентки без ХПВ 16, биопсијата кај 91 пациентки не потврди високоризична лезија. Во групата од 31 пациентки со ХПВ 16, кај 19 пациентки беше добиен позитивен резултат за CIN2+ лезија.

Разликата во пропорцијата на позитивни наоди за HPV 16 со типизација и позитивни наоди со биопсија не беше сигнификантно различна (0.2153 vs 0.2847, p=0.123). (табела 34, слика 27)

Табела 34. Резултати од ХПВ типизација на 16 наспроти биопсија

ХПВ 16	биопсија		вкупно	p-level
	<CIN 2+	>CIN 2+		
не	91 88,35	22 53,66	113	McNemar X ² =2.38 p=0.123
да	12 11,65	19 46,34	31	
вкупно	103	41	144	



Слика 27. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за ХПВ 16 наспроти биопсија

Во табела 34а прикажани се дијагностичките перформанси на ХПВ типизацијата на 16 како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

Табела 34а. Валидност на ХПВ 16 во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

ХПВ 16	Value	95% CI
Sensitivity	46.34%	30.66% to 62.58%
Specificity	88.35%	80.53% to 93.83%
Positive Likelihood Ratio	3.98	2.13 to 7.44
Negative Likelihood Ratio	0.61	0.45 to 0.81
Positive Predictive Value	61.29%	45.86% to 74.75%
Negative Predictive Value	80.53%	75.53% to 84.72%
Accuracy	76.39%	68.60% to 83.06%

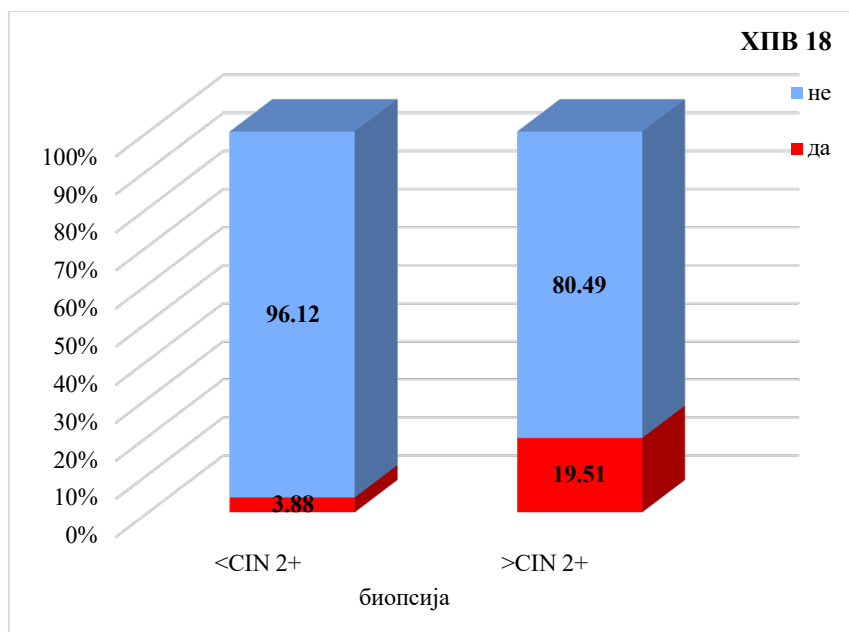
Во групата од 132 пациентки без ХПВ 18, биопсијата кај 99 пациентки не потврди високоризична лезија. Во групата од 12 пациентки со ХПВ 18, кај 8 пациентки беше добиен позитивен резултат за CIN2+ лезија.

Разликата во пропорцијата на позитивни наоди за HPV 18 со типизација и позитивни наоди со биопсија беше сигнификантно различна (0.0833 vs 0.2847, $p < 0.0001$). (табела 35, слика 28)

Табела 35. Резултати од ХПВ типизација за 18 наспроти биопсија

ХПВ 18	биопсија		вкупно	p-level
	<CIN 2+	>CIN 2+		
не	99	33	132	McNemar $\chi^2=21.19$ *** $p=0.00000$
да	4	8	12	
вкупно	103	41	144	

***sig $p < 0.0001$



Слика 28. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за ХПВ 18 наспроти биопсија

Во табела 35а прикажани се дијагностичките перформанси на ХПВ типизацијата на 18 како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

Табела 35а. Валидност на ХПВ 18 во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

ХПВ 18	Value	95% CI
Sensitivity	19.51%	8.82% to 34.87%
Specificity	96.12%	90.35% to 98.93%
Positive Likelihood Ratio	5.02	1.60 to 15.78
Negative Likelihood Ratio	0.84	0.72 to 0.98
Positive Predictive Value	66.67%	38.91% to 86.27%
Negative Predictive Value	75.00%	71.97% to 77.80%
Accuracy	74.31%	66.36% to 81.22%

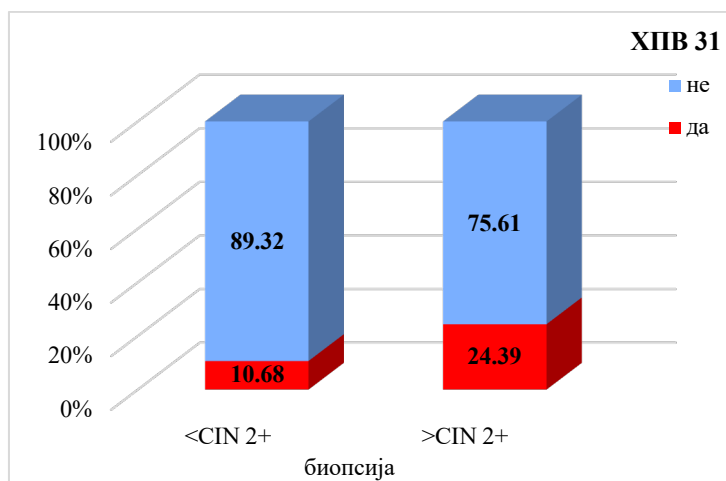
Во групата од 123 пациентки без ХПВ 31, биопсијата кај 92 пациентки не потврди високоризична лезија. Во групата од 21 пациентки со ХПВ 31, кај 10 пациентки беше добиен позитивен резултат за CIN2+ лезија.

Разликата во пропорцијата на позитивни наоди за HPV 31 со типизација и позитивни наоди со биопсија беше сигнификантно различна (0.1458 vs 0.2847, p=0.0034). (табела 36, слика 29)

Табела 36. Резултати од ХПВ типизација за 31 наспроти биопсија

ХПВ 31	биопсија		вкупно	p-level
	<CIN 2+	>CIN 2+		
не	92 89,32	31 75,61	123	McNemar $\chi^2=8.59$ **p=0.0034
да	11 10,68	10 24,39	21	
вкупно	103	41	144	

**sig p<0.01



Слика 29. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за ХПВ 31 наспроти биопсија

Во табела 36а. прикажани се дијагностичките перформанси на ХПВ типизацијата на 31 како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

Табела 36а. Валидност на ХПВ 31 во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

ХПВ 31	Value	95% CI
Sensitivity	24.39%	12.36% to 40.30%
Specificity	89.32%	81.69% to 94.55%
Positive Likelihood Ratio	2.28	1.05 to 4.96
Negative Likelihood Ratio	0.85	0.70 to 1.02
Positive Predictive Value	47.62%	29.50% to 66.39%
Negative Predictive Value	74.80%	71.13% to 78.14%
Accuracy	70.83%	62.68% to 78.10%

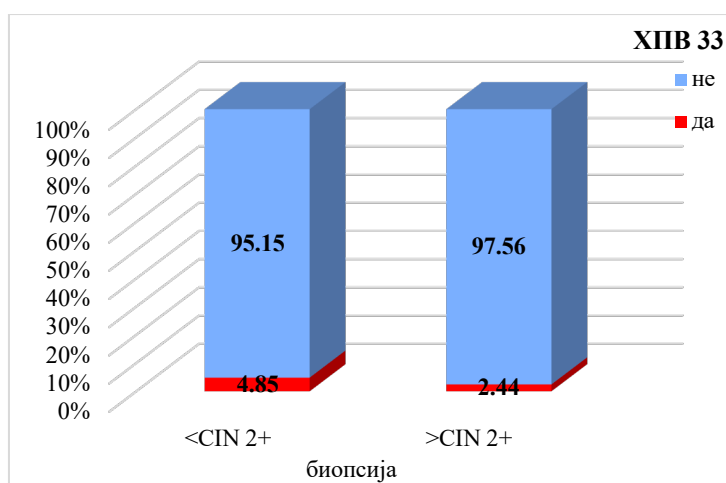
Во групата од 138 пациентки без ХПВ 33, биопсијата кај 98 пациентки не потврди високоризична лезија. Во групата од 6 пациентки со ХПВ 33, кај 1 пациентка беше добиен позитивен резултат за CIN2+ лезија.

Разликата во пропорцијата на позитивни наоди за HPV 33 со типизација и позитивни наоди со биопсија беше сигнификантно различна (0.0417 vs 0.2847, $p < 0.0001$). (табела 37, слика 30)

Табела 37. Резултати од ХПВ типизација за 33 наспроти биопсија

ХПВ 33	биопсија		вкупно	p-level
	<CIN 2+	>CIN 2+		
не	98	40	138	McNemar $\chi^2=25.69$ ***p=0.00000
да	5	1	6	
вкупно	103	41	144	

***sig p<0.0001



Слика 30. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за ХПВ 33 наспроти биопсија

Во табела 37а прикажани се дијагностичките перформанси на ХПВ типизацијата на 33 како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

Табела 37а. Валидност на ХПВ 33 во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

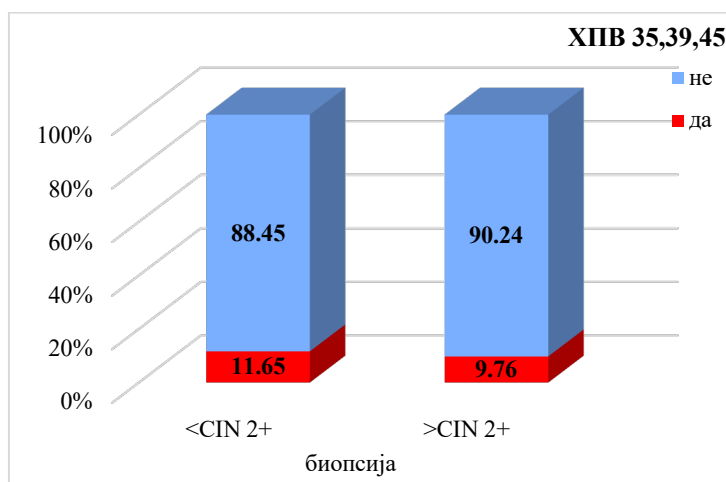
ХПВ 33	Value	95% CI
Sensitivity	2.44%	0.06% to 12.86%
Specificity	95.15%	89.03% to 98.41%
Positive Likelihood Ratio	0.50	0.06 to 4.17
Negative Likelihood Ratio	1.03	0.96 to 1.09
Positive Predictive Value	16.67%	2.35% to 62.41%
Negative Predictive Value	71.01%	69.66% to 72.34%
Accuracy	68.75%	60.50% to 76.21%

Во групата од 128 пациентки без ХПВ 35,39 и 45, биопсијата кај 91 пациентки не потврди високоризична лезија. Во групата од 16 пациентки со ХПВ 35,39 и 45, кај 4 пациентки беше добиен позитивен резултат за CIN2+ лезија. Разликата во пропорцијата на позитивни наоди за HPV 35,39 и 45 со типизација и позитивни наоди со биопсија беше сигнификантно различна (0.1111 vs 0.2847, p=0.00011). (табела 38, слика 31)

Табела 38. Резултати од ХПВ типизација за 35,39 и 45 наспроти биопсија

ХПВ 35,39,45	биопсија		вкупно	p-level
	<CIN 2+	>CIN 2+		
не	91 88,45	37 90,24	128	McNemar $\chi^2=11.75$ ***p=0.00061
да	12 11,65	4 9,76	16	
вкупно	103	41	144	

***sig p<0.0001



Слика 31. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за ХПВ 35,39,45 наспроти биопсија

Во табела 38а прикажани се дијагностичките перформанси на ХПВ типизацијата на 35,39 и 45 како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

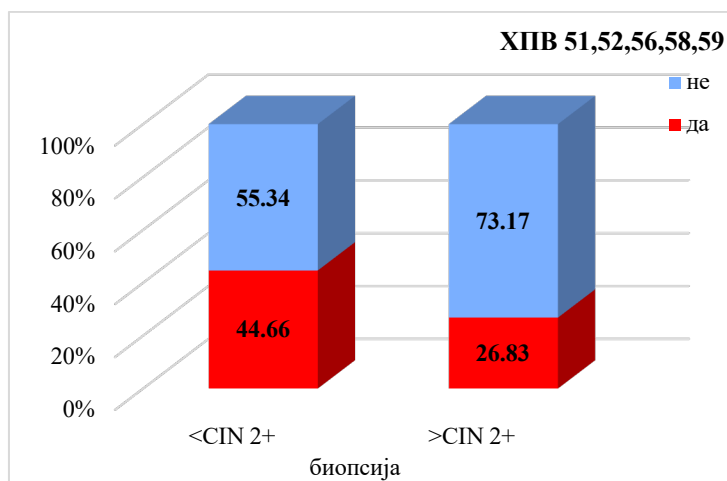
Табела 38а. Валидност на ХПВ 35,39,45 во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

ХПВ 35,39,45	Value	95% CI
Sensitivity	9.76%	2.72% to 23.13%
Specificity	88.35%	80.53% to 93.83%
Positive Likelihood Ratio	0.84	0.29 to 2.45
Negative Likelihood Ratio	1.02	0.90 to 1.15
Positive Predictive Value	25.00%	10.24% to 49.34%
Negative Predictive Value	71.09%	68.51% to 73.55%
Accuracy	65.97%	57.62% to 73.65%

Во групата од 87 пациентки без ХПВ 51,52,56,58 и 59, биопсијата кај 57 пациентки не потврди високоризична лезија. Во групата од 57 пациентки со ХПВ 51,52,56,58 и 59, кај 11 пациентки беше добиен позитивен резултат за CIN2+ лезија. Разликата во пропорцијата на позитивни наоди за HPV 51,52,56,58 и 59 со типизација и позитивни наоди со биопсија не беше сигнификантно различна (0.3958 vs 0.2847, p=0.085). (табела 39, слика 32)

Табела 39. Резултати од ХПВ типизација за 51,52,56,58,59 наспроти биопсија

ХПВ 51,52,56,58,59	биопсија		вкупно	p-level
	<CIN 2+	>CIN 2+		
не	57	30	87	McNemar $X^2=2.96$ p=0.085
да	46	11	57	
вкупно	103	41	144	



Слика 32. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за ХПВ 51,52,56,58,59 наспроти биопсија

Во табела 39а прикажани се дијагностичките перформанси на ХПВ типизацијата на 51,52,56,58,59 како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

Табела 39а. Валидност на ХПВ 51,52,56,58,59 во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

ХПВ 51,52,56,58,59	Value	95% CI
Sensitivity	26.83%	14.22% to 42.94%
Specificity	55.34%	45.22% to 65.14%
Positive Likelihood Ratio	0.60	0.35 to 1.04
Negative Likelihood Ratio	1.32	1.03 to 1.70
Positive Predictive Value	19.30%	12.13% to 29.29%
Negative Predictive Value	65.52%	59.58% to 71.01%
Accuracy	47.22%	38.85% to 55.71%

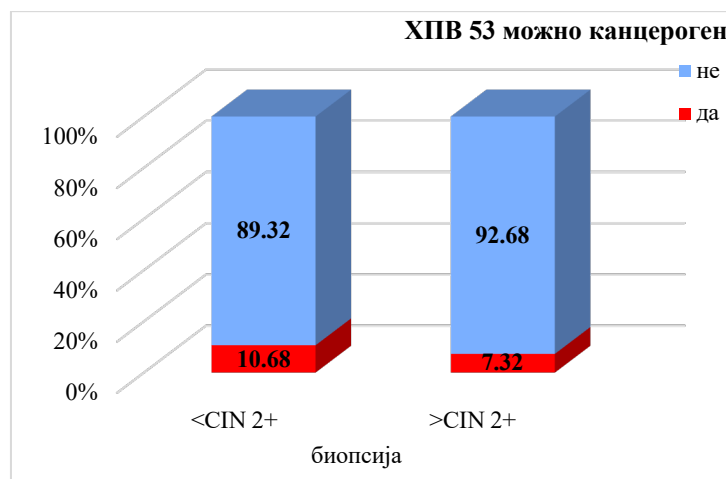
Во групата од 130 пациентки без ХПВ 53, биопсијата кај 92 пациентки не потврди високоризична лезија. Во групата од 14 пациентки со ХПВ 53, кај 3 пациентки беше добиен позитивен резултат за CIN2+ лезија.

Разликата во пропорцијата на позитивни наоди за HPV 53 со типизација и позитивни наоди со биопсија не беше сигнификантно различна (0.0972 vs 0.2847, $p=0.0001$). (табела 40, слика 33)

Табела 40. Резултати од ХПВ типизација за 53 наспроти биопсија

ХПВ 53 можно канцероген	биопсија		вкупно	p-level
	<CIN 2+	>CIN 2+		
не	92	38	130	McNemar $\chi^2=13.79$ *** $p=0.0002$
да	11	3	14	
вкупно	103	41	144	

***sig $p<0.0001$



Слика 33. Графички приказ на дистрибуција на позитивни и негативни резултати за ХПВ 53 наспроти биопсија

Во табела 40а прикажани се дијагностичките перформанси на ХПВ типизацијата на 53 како маркер за дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката.

Табела 40а. Валидност на ХПВ 53 во дијагностицирање на >CIN 2+ лезии на грлото на матката

ХПВ 53	Value	95% CI
Sensitivity	7.32%	1.54% to 19.92%
Specificity	89.32%	81.69% to 94.55%
Positive Likelihood Ratio	0.69	0.20 to 2.33
Negative Likelihood Ratio	1.04	0.93 to 1.16
Positive Predictive Value	21.43%	7.42% to 48.12%
Negative Predictive Value	70.77%	68.47% to 72.97%
Accuracy	65.97%	57.62% to 73.65%

Табела 41. Во табелата е прикажана дистрибуцијата во апсолутен број на цитолошките наоди компарирано со хистолошкиот наод, p16/Ki-67 dual staining и HPV статусот

Цитологија	Но-број	CIN 2+ на биопсија	имуноцитохемија p16/Ki-67 dual staining	HPV 16/18
ASC-US	9	0	0	2
HPV cervicitis	78	15	12	23
CIN1	12	3	1	4
CIN2	5	2	1	1
CIN3	5	1	1	1
ASC-H	21	12	13	6
AGC	1	1	1	1
CIS	2	2	1	1
вкупно	133	36	30	39

Табела 42. Во табелата прикажана е дистрибуцијата на LBC цитолошките наоди, Хистологијата, p16/Ki-67 dual staining (двојното боење) и HPV статусот кај испитаничките

	No	хистологија	No	p16/Ki-67		HPV 16/18	
ASC-US	9	cervicitis	7	+	0	+	0
				-	7	-	7
		LSIL	2	+	0	+	2
				-	2	-	0
HPV cervicitis	78	cervicitis	42	+	0	+	3
				-	42	-	39
		LSIL	21	+	3	+	9
				-	18	-	12
		HSIL	11	+	7	+	10
				-	4	-	1
		Ca	4	+	2	+	1
				-	2	-	3
CIN1	12	cervicitis	6	+	0	+	1
				-	6	-	5
		LSIL	3	+	1	+	0
				-	2	-	3
		HSIL	3	+	0	+	3
				-	3	-	0
CIN2	5	cervicitis	2	+	0	+	0
				-	2	-	2

		LSIL	1	+	0	+	0
				-	1	-	1
		HSIL	2	+	1	+	1
				-	1	-	1
CIN3	5	cervicitis	1	+	0	+	0
				-	1	-	1
		LSIL	3	+	0	+	0
				-	3	-	3
		HSIL	1	+	1	+	1
				-	0	-	0
ASC-H	21	cervicitis	4	+	3	+	0
				-	1	-	4
		LSIL	5	+	3	+	0
				-	2	-	5
		HSIL	9	+	1	+	5
				-	8	-	4
		Ca	3	+	1	+	1
				-	2	-	2
AGC	1	HSIL	1	+	1	+	1
				-	0	-	0
CIS	2	Ca	2	+	1	+	1
				-	1	-	1

ДИСКУСИЈА

Во досегашните испитувања цитологијата односно PAP тестот покажува висока специфичност но релативно ниска сензитивност од 30 до 80% за детекција на интраепителни лезии од висок градус. Овој метод има ниска сензитивност поради високата стапка на лажно-негативни резултати. Сензитивноста на HPV тестот е висока околу 90% но, специфичноста е мала, со висока негативна предиктивна вредност. Затоа детекцијата на високо ризичен HPV се употребува за подобрување на сензитивноста на цитологијата. Поради ниската специфичност кај HPV DNA тестирањето, многу жени ќе бидат упатени на колпоскопија, особено млади жени под 30-годишна возраст бидејќи кај таа популација има највисока преваленца на HPV. Имајќи го предвид фактот дека поголемиот дел од HPV инфекциите се минливи и не предизвикуваат преканцер на грлото на матката, потребни се ефикасни методи за тријажа на пациентките за да се спречи зголемувањето на бројот на упатувања за колпоскопија и биопсија за хистопатолошка анализа.

Двојно боење p16/Ki-67 (dual staining) претставува имуноцитохемиско обојување кое открива клетки во активна трансформација предизвикана од високоризични HPV инфекции. **CINtec® PLUS Cytology**, тестот за двојно боење p16/Ki-67, е одобрен од FDA во март 2020 година за тријажа на жени со позитивен резултат за високоризичен HPV (hrHPV) скрининг.

Тестот работи преку идентификација на ко-експресија на двата маркери – p16 и Ki-67 – во иста цервикална клетка. Присуството на овие протеини во иста клетка укажува на нарушена регулација на клеточниот циклус поради дејството на онкогените HPV протеини.

Оваа метода овозможува подобра стратификација на ризикот во споредба со конвенционалната цитологија, со што се подобрува прецизноста во откривање на жените со зголемен ризик за CIN2+ лезии и се овозможува навремена колпоскопска или хистолошка евалуација.

Во студија спроведена на Клиниката за Гинекологија и Акушерство се анализирани 145 пациентки кај кои е направена цитолошка анализа (LBC), HPV типизација и двојноцитолошко боење со p16/Ki-67. Просечната возраст беше 38.5 ± 11.8 години. Етничката структура ја сочинуваа 136 (93.79%) Македонки, 7 (4.83%) Албанки и 2 (1.38%) пациентки од Турска националност. Пушачи се 38 (26.21%) пациентки.

Од вкупниот број на испитанички нашите податоци потврдија дека 21,38% од испитаничките беа **позитивни на имуноцитохемиското испитување за p16/Ki-67 (dual staining)**. Студијата „STAIN-IT“ (492 примероци) покажа дека стапката на dual-stain позитивни резултати се зголемува со сериозноста на лезиите, на пример: околу 30.6% позитивни кај нормална хистологија до 86.8% позитивни кај CIN3 и 87.5% кај карцином. Ова практично значи дека околу 30% од сите жени во едно просечно опсервациско скринирање можат да имаат позитивен p16/Ki-67 тест, што е во рамките на нашите 21.38% во општата популација [91].

Во голема студија спроведена кај 1509 HPV-позитивни жени, позитивноста на p16-Ki-67 dual stain е вариријабилна со цитолошката и хистолошката градација: околу 31% позитивни кај HPV-позитивни со нормална цитологија, до 92% позитивни кај жени со HSIL и 86% позитивни кај жени со CIN3 на биопсија, што покажуа сличен процент со нашето испитување [92].

Кинеска мултицентрична студија на 1079 жени пријавува околу 18.4% позитивност на p16/Ki-67 кај нормална хистологија, со повисоки стапки кај повисоки степени на CIN (81–93%) [93]. Заклучно, нашите 21.38% позитивни случаи се во слична дистрибуција на голем дел од објавените искуства: кога dual stain се користи кај популација од општ скрининг или HPV-позитивни жени без големи хистолошки лезии, позитивноста често е во опсег околу 20–30%.

Во нашата студија од вкупно 145 пациентки 27.59% имаат детектиран **високоризичен HPV тип 16 или 18**, 72.41% се негативни за овие типови на HPV. Тоа би значело околу 1/4 од пациентките се носители на највисокоризичните типови, што е значајна бројка за јавноздравствено следење и превенција. Во мета-анализа која вклучува голема популација од 157 879 жени докажала дека 32% од HPV позитивните носители имаат HPV16 или HPV18 или двата во целата светска

популација [94]. Во нашиот наод 27.59% позитивни за HPV 16/18 (од 145 анализирани) е во рамките на глобално пријавените 30–32% кои имаат HPV16 или HPV18 во HPV-позитивни популации. Преваленца во нашата студија е во очекуваниот опсег за HPV позитивната популацијата.

Во резултатите од нашето истражување негативен **PAP тест** се доби 8.28%, LSIL 68.28%, HSIL 23.44% од пациентките кои беа hr HPV позитивни. Ова покажува дека поголем дел од HPV-позитивните пациенти имаат LSIL, а значен дел (23%) имаат HSIL. Во студија од 2025 година со 3510 жени, абдормални цитолошки наоди се значително повисоки особено LSIL и HSIL кај пациентки со високоризичен ХПВ. Тоа значи дека HPV-позитивноста силно се поврзува со цитолошки абнормалности (LSIL и HSIL). Иако процентите се различни, студиите покажуваат јасна корелација помеѓу HPV-позитивност и цитолошка абнормалност, особено LSIL и HSIL [95].

Дистрибуција на пациентките во нашата студијата со позитивна цитологија во однос на **LSIL** лезии HPV cervicitis имаа 78%, ASC-US 9 %, CIN1 13% од вкупно 100. Во студијата на Guanglei Zhong и соработници LSIL случаи може да имаат мешани наоди, вклучувајќи ASCUS или CIN1 или само цитолошко присуство на ХПВ кај пациентки кој се докажано HPV позитивни [96].

Во нашата студија во групата пациентки со **HSIL** лезии, 61.76% имаа лезија од типот ASC-H, 2.94 % имаа AGC преканцерозна лезија, 14.71 % пациентки имаа CIN2 и CIN3, поединечно, кај 5.88 % пациентки цитологија покажа постоење на CIS (carcinoma in situ). Во студија спроведена во Кина во 2024 година со 1183 пациенти со ASC-H/HSIL 59.2 % имале CIN2/3 по биопсија и 1.6 % имале adenocarcinoma in situ (AIS). Ова значи дека голем дел од пациентите со HSIL или ASC-H навистина се потврдуваат како лезии од висок градус по хистологија, што е во согласност со нашите податоци за CIN2 и CIN3 14.71 % пациентки. ASC-H има релативно висок ризик за CIN2+ (~50 %+) во многу студии, кај што PPV (positive predictive value) за CIN2+ е околу 50–60 % што е споредливо со резултатите што ги добивме во нашата студија [97].

Хистолошки верифицирана интраепителна лезија од висок градус (CIN2+) е детектирана кај 28.47% од пациентите позитивни на HPV скринингот. Во најнова

студија спроведена во Норвешка од 2025 година со 1,944 HPV-DNA позитивни жени, процентот на хистолошки CIN2+ во целокупната HPV-позитивна група е: 28.1 % CIN2+ за HPV позитивни жени (високоактивни инфекции) и 7.4 % CIN2+ кај HPV-DNA позитивни со нормална цитологија. Овие резултати се многу блиску до нашиот процент [98]. Во објавена студија во 2024 година за CIN2+ лезии детекција кај HPV-позитивни пациенти со различни цитолошки групи: CIN2+ преваленцата е 14.6 % во целокупната HPV-позитивна група, 30.1 % кај HPV16/18 позитивни а 10.2 % кај други HR-HPV групи [99].

Во нашата студија од сите пациентки кој се **HPV позитивни хистолошките наоди** од биопсија кај 45.83% пациентки презентираат присуство на cervicitis, кај 25.69% интраепителна лезија од низок степен, кај 22.22% интраепителна лезија од висок градус, кај 6.25% пациентки малигна промена на грлото на матката (тука се вбројуваат и пациентките со *in situ* малигна неоплазма). Во една клиничка кохортна серија со 419 пациентки кои поминаа биопсија под колпоскопија, 52 % биле дијагностицирани со cervicitis, што е слично на нашите 46 % [100]. Во публикација од 2024 година кои ги анализираат хистолошките наоди кај HPV-позитивни групи, процентот на CIN1/LSIL е 35.2 % каде хроничното воспаление и лезии од низок степен се доминантно докажани. Истата студија потврдува дека проценти на лезиите од висок градус CIN2/3 варираат во зависност од популацијата и методите на триажа, но често се помеѓу 10 % и 40 % во групи каде се користат HPV тестови и колпоскопија како дијагностички алгоритми што е приближно споредливо со нашите 26.22 % [101].

Во нашата студија лезии од **CIN2+ на биопсија** несигнификантно почесто е дијагностицирана кај пациентките постари од 40 години 33.9% vs 24.71%. Публикација од 2020 година покажа дека CIN2+ може да се појави почесто во помлади возрасни групи под одредени услови, особено кај HPV16 позитивни жени што значи дека зависноста од возраст не е универзална за сите популации. Податоците покажаа повисок ризик за CIN2+ кај помлади лица (<40) во некои групи, што е спротивно на нашиот наод, но ова може да се должи на разлики во HPV генотипови и цитолошки резултати. Во публикацијата кај што детално се анализирани возрасните групи, се гледа дека CIN2+ ризик може да варира со возраста, но не е секогаш повисок кај постари групи најчесто се нагласува повисок

ризик кај жени со HPV16/18, независно од возраст. Овие податоци покажуваат дека возраста сама по себе не е единствен фактор, но често постои интеракција со други ризик-фактори како HPV-тип, цитолошкиот наод, перзистентна инфекција итн. [102]. Во студија од 2024 година појавата на CIN3+ се зголемува со возраста, особено при перзистентни HPV инфекции или кога се користи HPV HPV16/18 генотипизација. Одредени студии пријавиле повисок CIN2+ ризик кај постари групи во одредени популации, што е компатибилно со нашиот наод за повисока честота кај >40 години. [103].

Во нашата анализа просечната возраст на пациентките со HPV цервицитис беше 36.5 ± 10.8 години, на пациентките со LSIL лезија 38.8 ± 12.4 години, на пациентките со HSIL лезија 40.3 ± 11.6 години, пациентките со малигна лезија беа со просечна возраст од 48.0 ± 12.7 години, со вкупна статистичка сигнификантна разлика, за $p=0.036$. Во истражување објавено во *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* со анализа на хистологијата и возраст: Пациенки со cervicitis беа со просечна возраст околу 46 години, со CIN1 (LSIL) - 48 години, со CIN2 - 42 години, со CIN3 - 44 години, Инвазија имаа на просечна возраст од 56 години. Овие податоци покажуваат растечки тренд на возраст со зголемување на степенот на лезијата, слично како и во нашата студија [104]. Во корелација со студија од Полска од 2025 година лезии од низок градус често (LSIL и cervicitis) се наоѓаат обично кај поминати репродуктивни години (30-40), HSIL често преминува околу 40-те, инвазивни или малигни заболувања се почести кај постари жени (>45-50 години). Тоа се должи на биолошки логика поради возрасните промени бидејќи имунолошкиот одговор ослабува со зголемување на возраста и присуството на перзистентни HPV инфекции може да прогресираат кон HSIL и карцином. Истражувањата покажуваат дека постари жени имаат поголем ризик за лезии од висок градус и карцином, особено ако имаат перзистентна HPV инфекција или анамнеза за абнормални наоди, слично како во нашите резултати [105].

Во нашите резултати **просечната возраст** на пациентките со хистолошки верифицирана интраепителна лезија од висок градус (CIN2+) изнесуваше 42.0 ± 12.1 години, просечната возраст на пациентките со <CIN 2+ лезија беше 37.4 ± 11.4 години. Корелацијата со најнова студија од 2026 година потврдуваат дека лезии од висок градус (CIN2+) обично се наоѓаат во подоцнежни возрасни групи. Од

анализата на CIN2+ лезиите покажува дека хистолошките лезии од висок градус се присутни низ различни возрастни групи, но инциденцата достигнува врв во 30-те и 40-те години, пред да се намали во постари групи. Повисока средна возраст кај CIN2+ е во согласност со некои популациски податоци. Во студија што опфаќа голема група жени со hrHPV, просечната возраст на жени со CIN2+ често се движи околу средните 30-ти до раните 40-ти, што се поклопува со нашите резултати од 42 години [106].

Во нашата анализа **пушачите сигнификантно почесто од непушачите** имаа хистолошки верифицирана интраепителна лезија од висок градус CIN2+, (47.37% vs 21.7%). Систематска мета-анализа спроведена до 2023 година истакнува дека тековни и поранешни пушачи имаат повисок ризик за преинвазивни лезии (вклучувајќи CIN2+) и рак во споредба со непушачи. Ризикот за преинвазивни лезии бил 2.1 пати поголем кај тековните пушачи [107]. Најпоследна мета анализа на 59 трудови во период од 1999 до 2025 година објавена 2026 година исто така потврдуваат дека актуелните пушачи имаат значително повисок ризик за лезии од висок градус и инвазивен карцином споредено со непушачи, со јасна доза-однос зависност по број на цигари [108], како што е резултатот од нашата анализа. Голема мета анализа покажува дека активното пушење е јасен ризик-фактор за CIN2+, додека улогата на пасивно изложување (без активно пушење) е поблага и помалку статистички значајна кога нема активни пушачи во групата [109].

Во нашите резултати **невакцинираните сигнификантно почесто од вакцинираните** (каде нема ниту еден пациент) имаа хистолошки верифицирана интраепителна лезија од висок градус, CIN2+ (31.3% vs 0%). HPV вакцинацијата значително ја намалува инциденцата на високоградусни цервикални лезии (CIN2+) кај вакцинирани жени во споредба со невакцинирани. Во една 15-годишна студија од Норвешка објавена 2024 година, жени во вакцинираните кохорти имале значително помал ризик за CIN2+, со OR 9.02 (95% CI 5.9-13.8) за појавување на лезии од висок градус од невакцинирани. Ниту една вакцинирана жена со CIN2+ немала позитивен тест за HPV16/18, и ниту еден случај на карцином на грлото на матката не бил регистриран кај вакцинирани во таа група, додека тоа било присутно кај невакцинирани [110]. Во студија од 2025 година вакцинацијата со HPV (2-, 4- или 9-валентна) е поврзана со големи намалувања на ризикот за CIN2+ и CIN3+,

јасна е редукација на инциденцата до 60–80% или повеќе во популациски анализи споредено со невакцинирани [110]. Во нашата студија 31.3% CIN2+ кај невакцинирани во нашата студија и 0% кај вакцинирани директно корелира со широко прифатени податоци дека HPV вакцинацијата драстично го намалува ризикот од CIN2+ лезии. Ова е најсилно изразено кај популации каде вакцинацијата започнала порано во животот и пред изложеност на HPV. Литературата потврдува драматичен пад во честотата на CIN2+ кај вакцинираните индивидуи кој често се манифестира како многу поголемо намалување во споредба со невакцинираните, што е во согласност со нашиот наод [111].

Во нашата студија вагинална инфекција со **Chlamydia trachomatis** сигнификантно почесто е докажана кај пациентките со ХПВ тип 16/18, (15% vs 4.76%), $p=0.037$. Во студија од 2019 година постојат силни докази дека HPV и *Chlamydia trachomatis* се поврзани взаемно, мета-анализата покажува дека жените со *Chlamydia trachomatis* имаат 2.3 пати повисок ризик за високоризичен HPV инфекција, а HPV-позитивни жени имаат 2.2 пати повисока веројатност да бидат *Chlamydia* позитивни. Ова значи дека инфекциите не се независни една од друга [112]. Во едно голема обсервациска студија истражување од Кина (2020), *Chlamydia* беше почеста кај HPV-позитивни жени (7.6%) отколку кај HPV-негативни (4.2%), и двата агенси може да бидат заеднички фактори за ризик од цервикални заболувања. Ваквите податоци покажуваат дека ваквите коинфекции се релативно чести, особено кај помлади жени и кај оние што имаат сексуални ризик-фактори, и дека *Chlamydia* честопати ја менува микросредината каде HPV инциденцата е повисока [113]. *Chlamydia trachomatis* честопати се појавува кај жени со HPV инфекција, а посебно кај оние со високоризични типови како 16/18, и ова соединување е поврзано со повисок ризик за развој или перзистентност на инфекцијата.

Пациентките со HPV тип 16/18 во нашата студија имале поголема стапка на инфекција со **Ureaplasma urealyticum** во споредба со оние без овие типови (7.5% vs 5.71%). Овој наод е во согласност со PubMed-базираните студии кои покажуваат дека *Ureaplasma urealyticum* и други родови на микоплазми се почесто детектираат кај HPV-позитивни жени и дека постои асоцијација помеѓу овие бактерии и HPV инфекцијата. Систематски прегледи сугерираат дека *U. urealyticum* е поврзана со

повисок ризик за HPV инфекција и абнормални цервикални наоди, што ја поддржува тезата дека вагиналните/цервикалните ко-инфекции можат да создадат микросредината која го олеснува перзистирањето или ширењето на HPV вирусот [114].

Во следниот дел од студијата ја анализираме сензитивноста, специфичноста, позитивната предиктивна вредност (PPV) и негативната предиктивна вредност (NPV) за секоја дијагностичка метода: LBC цитологијата, HPV типизацијата и двојното цитолошко боење p16/Ki-67 dual staining, како и ROC-кривата (receiver-operating characteristic) и плоштината под кривата AUC (Area Under the Curve) која е најважниот показател за да се процени точноста на секоја дијагностичка метода во идентификување на жени со интраепителни лезии од висок градус (CIN2+ лезии).

Во нашата студија, **AUC за LBC цитологија** како предиктор за присуство на хистолошка верифицирана интраепителна лезија од висок градус (>CIN2+) е 0.527 (95% CI 0.420–0.634), укажува на минимална дискриминаторска моќ и ограничена клиничка употребливост кога се користи како самостојна скрининг метода. Овој наод е во согласност со најновите податоци од литературата кои покажуваат дека цитологијата има релативно ниска сензитивност и ограничени AUC перформанси за CIN2+ во споредба со HPV-базирани методи. Во студија од Грузија, ПАП цитологија имаше AUC околу 0.55, значително понизок од AUC вредностите постигнати од HPV тестови 0.71 што укажува на супериорна точност на HPV-тестовите. Овие наоди ја истакнуваат потребата за примена на HPV-тестирања за подобра идентификација на лезии од висок градус [115].

Плоштината под **ROC кривата AUC** во нашата анализа има најголема вредност за истовремено присуство на **HPV 16/18**, од **0.732** (AUC=0.732, CI 95% 0.634-0.831). Плоштината под ROC кривата AUC (Area Under the Curve) за присуство на **HPV 16**, од 0.673 (AUC=0.673, CI 95% 0.568-0.779). Плоштината под ROC кривата AUC (Area Under the Curve) за присуство на **HPV 18 и 31**, од 0.578 (AUC=0.578, CI 95% 0.469-0.687) и од 0.569 (AUC=0.569, CI 95% 0.461-0.676), соодветно за тип 18 и 31. А останатите ХПВ типови соодветно **HPV 33- 0.488, HPV 35,39,45-0.491, HPV 51,52,56,58,59-0.411, HPV 53- 0.483**. Во студијата на Eun Hye

Cho и соработници од 2024 година алгоритмите за тријажа кои вклучуваат HPV16 и HPV18 имаат највисока дискриминаторска вредност од било кој поединечен тип во детекција на CIN 2+ лезии. HPV16/18 позитивноста е поврзана со најголем ризик од CIN2+ лезии докажани со студијата. HPV16/18 како комбинација обично ги надминува поединечните HPV типови по дискриминаторска способност. Истражувањата покажуваат дека HPV16 има највисока дискриминаторска способност, апсолутен ризик за CIN 2+ лезиите и најсилна патогеност меѓу сите поединечни ХПВ генотипови. HPV18 е значаен но, тој во повеќето студии не го надминува HPV16 по ризик за CIN2+, иако може да биде поважен кај аденокарциномите [116]. Во студија на Мајја Vahteristo и соработници нивното истражување ја рангира групата високоризични типови според кои HPV31/33/58 се како втор по големина ризик по HPV16 меѓу поединечните типови на HPV, но сепак пониски од HPV16 во дискриминаторска способност за CIN 2+ лезии [117]. Според корелацијата за дискриминаторската способност HPV16 има најдобра дискриминаторска способност меѓу поединечни типови после комбинацијата од HPV16/18, другите високоризични типови имаат помал дискриминаторски капацитет самостојно што е во согласност со нашите наоди.

Во анализа на нашата студија плоштината под **ROC кривата AUC (Area Under the Curve)** за имуноцитохемија **p16/Ki-67 Dual-Staining** во предикција на >CIN 2+ има вредност од **0.759** (AUC=0.759, CI 95% 0.66-0.857), што укажува дека p16/Ki-67 двојното цитолошко боење претставува добар предиктор во разграничување на пациенти со нискоризични и високоризични лезии на грлото на матката. Компарација со најновиот преглед од литература од 2026 година на Zhang H. и соработници на 21 студија со 6394 вклучени учесници за улогата на p16/Ki-67 dual staining (двојно боење) во предикција на CIN2+ за лезии од висок градус докажала дека AUC за CIN2+ = 0.88 (95% CI 0.85–0.90), што е повисоко од AUC за HPV тестовите (0.79). Dual staining има повисока специфичност за CIN2+ и CIN3+ во споредба со HPV тестовите. Ова ја потврдува добрата дијагностичка точност на p16/Ki-67 dual staining за лезии од висок градус. Во споредба со резултатот од нашата студија (AUC=0.759), оваа поголема анализа покажува исто или повисоко AUC, што укажува на добри перформанси на тријажниот тест во поширока популација. p16/Ki-67 dual-staining има добри до одлични перформанси за

предикција на CIN2+. Во поголем број публикации AUC >0.80 вредност многу блиска до нашата анализа AUC 0.759 [117].

Во нашата студија се анализирани **дијагностички перформанси на комбинирани алгоритми кои вклучуваат LBC цитологија, HPV тестирање и имуноцитохемиско двојно цитолошко боене p16/Ki-67** во детекција на \geq CIN2. Добиените AUC вредности покажуваат јасен тренд на подобрување на дискриминаторната моќност со додавање на повеќе биомаркери:

Цитологија + HPV + p16/Ki-67 \rightarrow AUC = 0.870

HPV + p16/Ki-67 \rightarrow AUC = 0.843

Цитологија + p16/Ki-67 \rightarrow AUC = 0.791

Овие резултати укажуваат дека тријажниот алгоритам кој ги комбинира сите три методи има највисока способност за разграничување на нискоризични од високоризични лезии. Во мета-анализата од февруари 2026 p16/Ki-67 dual stain има повисока дијагностичка точност за откривање CIN2+ од самиот HPV тест: AUC 0.88 за CIN2+ за p16/Ki-67 самостојно во тријажа на ASC-US/LSIL случаи, што е повисоко отколку HPV тестот. Ова се поклопува со нашата AUC 0.870 за цитологија + HPV + p16/Ki-67, што укажува дека комбинираниот алгоритам има добро AUC што е во согласност со најновите податоци, особено ако p16/Ki-67 се користи како тријажен тест. Во прегледни студии во период од 2024-2025 година го потенцираат важното значење на комбинираниите алгоритми (HPV + Pap + p16/Ki-67) за подобрена тријажа на HPV позитивни жени, со повисока сензитивност и специфичност во споредба со употреба на еден тест за детекција на лезии од висок градус. [117,118].

Прегледна студија од 2024 на Yung-Taek Ouh и соработници покажува дека p16/Ki-67 dual staining има повисока клиничка сензитивност и негативна предиктивна вредност за CIN2+ отколку само традиционална цитологија, што ја прави супериорна компонента во ко-тестирањето. Според AUC вредности општата тенденција е дека комбинирани алгоритми (Pap + HPV + p16/Ki-67) имаат подобра дијагностичка моќност од поединечни тестови [119].

Во студија фокусирана на HPV-позитивни жени е потенцирано дека p16/Ki-67 има повисока специфичност и повисока сензитивност во споредба со само PAP цитологија за CIN2+ лезии. Нашата комбинација HPV + p16/Ki-67 (AUC = 0.843) е компатибилна со литературата, каде AUC за p16/Ki-67 во HPV позитивни случаи често се движи во оваа зона или повисоко. Во оваа анализи AUC вредностите се движат помеѓу 0.82–0.86, што кореспондира со нашата вредност од 0.843 за комбинацијата HPV + p16/Ki-67. [120].

Во студијата на Тау и соработниците се потврдува дека p16/Ki-67 има поголема специфичност од HPV, HPV има поголема сензитивност и комбинацијата на тестовите обезбедува оптимален баланс. Нашите резултати го демонстрираат токму тој синергистички ефект, при што: Тројната комбинација (0.870) покажува супериорна дискриминација, Цитологија + p16/Ki-67 (0.791) останува добар, но инфериорен модел без HPV. Оттука, може да се заклучи дека нашите податоци се во согласност со Тау и соработници што е демонстрирано преку ROC кривите дека интегрираниот мултимодален пристап има највисока предиктивна вредност за \geq CIN2 [121].

Можеме да заклучиме дека најновите трудови ги потврдуваат трендовите што ги добивме во нашите AUC-резултати и ја поддржуваат употребата на p16/Ki-67 dual staining во комбинација со HPV и/или цитологија како подобен тријажен пристап за идентификација на лезии од висок градус (CIN2+). HPV тестирањето обезбедува висока сензитивност, но пониска специфичност. Цитологијата додава морфолошка проценка, а p16/Ki-67 детектира клеточна дисрегулација поврзана со трансформациона имтраепителна лезија. Комбинацијата на овие механизми резултира со повисока AUC со што го потенцира синергистички ефект на биомаркерите. Резултатите потврдуваат дека p16/Ki-67 има особена вредност кај HPV-позитивни жени, каде ја намалува потребата од непотребни колпоскопии а со што и се намалува бројот на биопсии за хистопатолошка анализа, што е потврдено и во најновите европски препораки. AUC од 0.870 се смета за „многу добра“ дијагностичка точност. Ова укажува дека комбинираниот алгоритам може да биде клинички оправдан како секундарна тријажа во организирани скрининг програми.

Во нашата студија резултатите за **валидноста на цитологија (LBC тест)** за дијагноза на CIN2+ лезии покажаа сензитивност 50.00%, специфичност 83.33%, PPV (позитивна предиктивна вредност) од 52.94% и NPV (негативна предиктивна вредност) од 81.63%. Овие наши резултати покажуваат умерена дијагностичка точност со релативно ниска сензитивност за откривање на CIN2+ (само 50%). Обемна мета-анализа на Rawan Tahboub и соработници од САД покажува дека стандардната цитологија има широк опсег на сензитивност (34% до 94%) за HSIL/CIN2+ со генерално висока специфичност, но со голема варијабилност помеѓу студиите. Систематски прегледни студии истакнуваат дека способноста на Pap тестот да открие CIN2+ е често ограничена и варира дури и во истите програми, зависно од квалитетот на земање примероци, обука на цитотехничари, и праг на позитивност. Цитологијата останува корисен тест, но има ограничена сензитивност за CIN2+, што значи дека многу лезии од висок градус може да бидат пропуштени ако се користи само цитологија. PPV често варира значајно кај различни популации и преваленци но нашите вредности се компатибилни со реални податоци од студијата. Нашите резултати за специфичност (>80%) и NPV (>80%) се во рамките на очекувањата од литературата, каде специфичноста за цитологијата често е повисока од сензитивноста [122].

Во нашата анализа е евалуирана дијагностичката **валидност на HPV 16/18** генотипизацијата во детекција на >CIN2+ лезии на грлото на матката. Добиените резултати покажуваат сензитивност од 60.98% и специфичност од 85.44%, со позитивна предиктивна вредност (PPV) од 62.50% и негативна предиктивна вредност (NPV) од 84.62%. Овие резултати се во согласност со податоците од мета-анализата на Marc Arbyn и соработници. Студијата покажува дека HPV16/18 генотипизацијата како тријажен метод има сензитивност од приближно 55–60% за CIN2+ и специфичност околу 80–85%, што практично кореспондира со резултатите од нашата студија. Слични вредности се пријавени и во големи европски скрининг-програми, каде HPV16/18 демонстрира умерена сензитивност, но релативно висока специфичност за детекција на високо-степени лезии.

Во студијата се нагласува дека примарниот hr-HPV тест (кој опфаќа повеќе високо-ризични типови) генерално покажува значително повисока сензитивност (>90%) за CIN2+, додека генотипизацијата за 16/18 се користи претежно како

тријажен тест кај HPV-позитивни жени. Ова укажува дека HPV16/18 тестирањето има поголема вредност во идентификација на популација со зголемен ризик отколку како самостоен скрининг метод. Специфичноста од 85.44% во нашата студија укажува на добра способност за исклучување на болеста кај HPV16/18 негативни жени. Високата NPV (84.62%) дополнително ја потврдува оваа клиничка вредност, бидејќи негативен тест значајно го намалува ризикот од присуство на >CIN2+ лезија. Од друга страна, умерената PPV (62.50%) е очекувана, со оглед дека предиктивните вредности директно зависат од преваленцата на болеста во испитуваната популација. Комбинацијата на висока специфичност и добра NPV овозможува безбедно следење на жени со негативен резултат, додека позитивниот резултат идентификува група со зголемен ризик која бара понатамошна дијагностичка евалуација (колпоскопија и биопсија) [123].

Во нашата студија е анализирана **дијагностичката валидност на HPV16** генотипизацијата во детекција на >CIN2+ лезии на грлото на матката. Добиените резултати покажаа сензитивност од 46.34% и специфичност од 88.35%, со позитивна предиктивна вредност (PPV) од 61.29% и негативна предиктивна вредност (NPV) од 80.53%. Овие резултати укажуваат дека HPV16 како изолиран генотип има добра способност за потврдување на болеста (висока специфичност), но ограничена способност за детекција на сите случаи на CIN2+ (пониска сензитивност). HPV16 е најканцерогениот и најчесто поврзаниот генотип со високо-степени цервикални лезии и инвазивен карцином. Мета-анализа предводена од Marc Arbyn покажува дека генотипизацијата за HPV16 има умерена сензитивност (приближно 55–60% за CIN2+, но повисока специфичност во споредба со широките hr-HPV тестови. Кога се анализира само HPV16, сензитивноста очекувано се намалува, бидејќи значителен дел од CIN2+ лезиите се поврзани со други високо-ризични HPV типови (31, 33, 45, 52, 58 и др.) Во таа насока, нашата сензитивност од 46.34% е нешто пониска од вредностите пријавени за HPV16/18 комбинирана генотипизација, но фактот дека тестирањето ограничено само на HPV16 нема да ги детектира сите >CIN2+ лезии. Ова потврдува дека HPV16 самостојно не е доволен како примарен скрининг тест, туку има поголема вредност како маркер за стратификација на ризик кај жени кои веќе се hr-HPV позитивни. Специфичноста од 88.35% во нашата студија е во рамките на очекуваните

вредности од литературата, каде тип-специфичните HPV тестови генерално покажуваат повисока специфичност отколку тестовите кои детектираат повеќе hr-HPV типови. Ова укажува дека HPV16 негативниот резултат релативно сигурно ја намалува веројатноста за присуство на >CIN2+ лезија, што се потврдува и со солидната NPV од 80.53%. PPV од 61.29% е умерено висок и ја одразува силната асоцијација помеѓу HPV16 инфекцијата и високостепените лезии. Сепак, предиктивните вредности се директно зависни од преваленцата на CIN2+ во испитуваната популација, па варијациите помеѓу студиите може да се објаснат со различен ризичен профил, возраст на испитаниците, како и со разлики во методологијата на тестирање [123].

Во нашата студија е анализирана **дијагностичката валидност на HPV18** генотипизацијата во детекција на >CIN2+ лезии на грлото на матката. Добиените резултати покажаа сензитивност од 19.51% и специфичност од 96,12%, со позитивна предиктивна вредност (PPV) од 66,67% и негативна предиктивна вредност (NPV) од 75,00%. Овие резултати покажуваат многу ниска сензитивност за HPV18 кога се користи како самостоен маркер за >CIN2+, но висока специфичност, што е типично за тестови кои таргетираат само еден високо-ризичен тип. Во студија од 2020 година од Норвешка HPV18 е признаен како втор најканцероген HPV тип по HPV16 и е поврзан со значителен ризик за лезии од висок градус и карцином. Во студијата HPV18 позитивност е поврзана со 10–16% CIN2+/CIN3+ во некои кохорти со нормална цитологија. Овие резултати се во согласност со студијата кои покажуваат дека HPV18 има значителен, но помал ризик во споредба со HPV16, и најдобро се користи како дел од поширок тријажен тест, наместо како самостојен маркер за скрининг. Високата специфичност е очекувана, затоа што само HPV18 позитивност значи дека мал број здрави лица ќе добијат лажно позитивен резултат [124].

Во нашата студија е анализирана **дијагностичката валидност на HPV31** генотипизацијата во детекција на >CIN2+ лезии на грлото на матката. Добиените резултати покажаа сензитивност од 24.39% и специфичност од 89.32%, со позитивна предиктивна вредност (PPV) од 47.62% и негативна предиктивна вредност (NPV) од 74.80%. Во Мета-анализа од 2025 година укажува дека HPV31 има пониска фреквенција на асоцијација со CIN2+ отколку HPV16/18, бидејќи

голем дел од лезиите од висок градус ги предизвикуваат најпрво HPV16, потоа HPV18. Сензитивноста на HPV31 често се под 30–35% за CIN2+, со специфичности повисоки од 85–90%. Нашата сензитивност од 24.39% е пониска, но во согласност со литературата за HPV31 кога се користи самостојно како маркер за CIN2+. Ова значи дека HPV31 не ги детектира поголемиот дел на лезии од висок градус бидејќи тие често се предизвикани од други високо-ризични HPV типови. Позитивната предиктивна вредност 47.6% укажува дека кај позитивни случаи постои умерен ризик за CIN2+, додека негативниот резултат 74.8% ја потврдува повисоката веројатност дека HPV31-негативни жени немаат високо-степенни лезии [125].

Во нашата студија беше анализирана **дијагностичката валидност на HPV33** генотипизацијата во детекција на >CIN2+ лезии на грлото на матката. Добиените резултати покажаа сензитивност од 2.44% и специфичност од 95.15%, со позитивна предиктивна вредност (PPV) од 16.67% и негативна предиктивна вредност (NPV) од 71.01%. HPV33 учествува со приближно 3–8% од сите CIN2+/CIN3+ случаи во глобални анализи. Има значително помала застапеност од HPV16 и HPV18. Кога се анализира изолирано, очекувано е многу ниска сензитивност, со висока специфичност (>90%). Сензитивноста во нашата студија е многу ниска, но во рамките на очекуваното поради ниската етиолошка застапеност. [126].

Во нашата студија е анализирана дијагностичката валидност на HPV 35,39,45 генотипизацијата во детекција на >CIN2+ лезии на грлото на матката. Добиените резултати покажаа сензитивност од 9,76% и специфичност од 71,09%, со позитивна предиктивна вредност (PPV) од 25,00% и негативна предиктивна вредност (NPV) од 71,09%. HPV45 има умерена поврзаност со аденокарцином и CIN2+, но сепак многу помала од HPV16, HPV35 и 39 се помалку застапени типови. Во мета-анализата, овие типови заедно учествуваат со 5–10% од CIN2+ случаите. [126].

Во нашата студија е анализирана дијагностичката валидност на HPV 51,52,56,58,59 генотипизацијата во детекција на >CIN2+ лезии на грлото на матката. Добиените резултати покажаа сензитивност од 26,83% и специфичност од 55,35%, со позитивна предиктивна вредност (PPV) од 19,30% и негативна

предиктивна вредност (NPV) од 65,52%. HPV52 и HPV58 се релативно почести во Азија и делови од Европа. Во глобални анализи, оваа група може да учествува со 15–25% од CIN2+ случаи, но индивидуално секој тип има помал удел. Кога се анализираат како група, сензитивноста се зголемува (што се гледа во нашата анализа – 26.8%), но специфичноста паѓа (55%), поради повисока општа преваленца. Овој тренд целосно одговара на литературата: поголема група на испиувани типови, поголема сензитивност но со пониска специфичност [127].

Во нашата студија е анализирана дијагностичката валидност на HPV 53 генотипизацијата како можно канцероген во детекција на >CIN2+ лезии на грлото на матката. Добиените резултати покажуваат сензитивност од 7,32% и специфичност од 89,32%, со позитивна предиктивна вредност (PPV) од 21,43% и негативна предиктивна вредност (NPV) од 70,77%. Во голема мета-анализа за распределба на HPV генотипови кај CIN2/3, HPV53 е пријавена меѓу почестите типови што не доминираат, но со релативно ниска застапеност (<5% во CIN2/3 група). Истражувањето покажува дека кај CIN2/3 групата доминираат HPV16, HPV58, HPV52 и HPV33, а HPV53 е меѓу помалку застапените [128].

Во нашата студија е анализирана **дијагностичката валидност на имуноцитохемија p16/Ki-67 Dual-Staining** во детекција на >CIN2+ лезии на грлото на матката. Добиените резултати покажаа сензитивност од 58,5% и специфичност од 93,2%, со позитивна предиктивна вредност (PPV) од 77,4% и негативна предиктивна вредност (NPV) од 84,96%. Во споредба со повеќето објавени мета-анализи од Sun и соработници, Arbyn и соработници., Zhang и соработници нашата студија прикажува пониска сензитивност (58.5% vs 80–90%) но, повисока специфичност (93.2% vs 58–75%) за детекција на CIN2+ лезии. Овој профил укажува дека во нашата популација p16/Ki-67 dual staining има изразена способност за исклучување на лажно позитивни случаи, но со намалена детекција на сите вистински позитивни случаи. Разликата може да се должи на различна преваленца на болеста, критериуми за позитивност на тестот, популациска селекција. Бидејќи во нашата студија p16/Ki-67 Dual-Staining тестот се користи како тријажен тест оттука, dual staining покажува потенцијал како високо специфичен тријажен тест, но помала сензитивност во однос на мета-аналитички

анализи. Нашата специфичност (93.20%) е повисока во однос на вредности од мета-аналитички студии (обично 58–73%). Ова укажува на голема способност за правилно идентификување на непозитивни случаи: Построги критериуми за позитивност често зголемуваат специфичност. Намалување на лажни позитивни резултати е корисно за намалување на непотребни колпоскопии и биопсии. [129,130].

Критериуми за позитивни тест може да се објасни со неколку фактори:

1. **Критериуми за позитивност** – Строги прагови за позитивен dual stain (на пр. >1 двојно позитивни клетки) можат да ја намалат сензитивноста.
2. **Популациски карактеристики** – Различни преваленци на CIN2+ и различни популации (тријажен тест vs обичен скрининг) може да влијаат на перформансите.
3. **Методолошки варијации** – Различни техники на подготовка, читливост и интерпретација на dual stain можат да ја променат клиничката сензитивност. [131, 132].

Во нашата студија е евалуирана поврзаноста помеѓу возраста, степенот на цервикална лезија и дијагностичката вредност на имуноцитохемиското p16/Ki-67 dual staining во детекција на >CIN2+ лезии. Резултатите беа споредени со најнови публикации, Sahin G и соработници (2025) и Ye C и соработници (2025), кои анализираат различни тријажни тестови кај пациентки со цервикални лезии. CIN2+ лезиите беа почести кај пациентките постари од 40 години (33.9% наспроти 24.71%) Постои статистички сигнификантна разлика во просечната возраст меѓу групите со прогресивно зголемување на возраста од HPV цервицитис (36.5 ± 10.8 години), преку LSIL (38.8 ± 12.4) и HSIL (40.3 ± 11.6), до малигни лезии (48.0 ± 12.7 години). Овој тренд ја рефлектира природната историја на HPV инфекцијата и постепената акумулација на молекуларни оштетувања што доведуваат до инвазивна болест. Слични наоди се прикажани во студијата на Sahin соработници која се фокусира на популација над 65 години. Авторите заклучуваат дека возраста претставува независен предиктор за CIN2+ лезии, особено во контекст на перзистентна HPV инфекција. Со зголемување на возраста расте веројатноста за перзистенција на

инфекцијата и прогресија кон високостепени лезии. Нашите резултати ја прошируваат оваа опсервација и во средовечна популација (>40 години), што сугерира дека возраста претставува континуиран, а не праг-зависен ризик-фактор. Во нашата студија, p16/Ki-67 dual staining покажа AUC од 0.759 (95% CI 0.66–0.857), што укажува на добра дискриминаторска способност во разграничување на нискоризични од високоризични лезии. Сензитивноста изнесуваше 58.5%, додека специфичноста беше висока 93.2%, со PPV од 77.4% и NPV од 84.96%. Високата специфичност укажува дека тестот има особена вредност во потврдување на лезии од висок градус и може да помогне во намалување на непотребни колпоскопски упатувања. Пониската сензитивност, од друга страна, сугерира дека dual staining не треба да се користи како единствен скрининг тест, туку како тријажна алатка, после реализиран скрининг со некој од скрининг тестовите. Sahin и соработниците прикажуваат дека p16/Ki-67 dual staining во комбинација со HPV тестирање и колпоскопија ја подобрува дијагностичката точност кај жени над 65 години. Нивните резултати исто така покажуваат висока специфичност, што е во согласност со нашите наоди. Разликите во сензитивноста може да се должат на различната старосна структура, преваленцата на болест и различната дистрибуција на цитолошки абнормалности.

Важно е да се нагласи дека **p16/Ki-67 dual staining** претставува маркер на биолошка трансформација, коекспресијата на p16 (супресор на клеточен циклус) и Ki-67 (пролиферативен маркер) во иста клетка укажува на дерегулиран клеточен циклус предизвикан од онкогена HPV активност. Оттука, тестот не ја мери само присутноста на вирусот, туку неговото биолошко влијание врз клетката. Клучната разлика помеѓу двата теста лежи во нивото на биолошка проценка:

- *HPV генотипизацијата проценува вирусолошки ризик.*
- *p16/Ki-67 dual staining проценува клеточна трансформација.*

Додека HPV генотипизацијата идентификува жени со потенцијално висок ризик, dual staining идентификува жени кај кои трансформацијата веќе е биолошки активна. Ова ја прави **p16/Ki-67 dual staining** методата особено вредна во

разграничување на транзиторни од клинички релевантни инфекции. [132,133,134].

Во согласност со нашите резултати и современите литературни податоци, p16/Ki-67 dual stain цитологијата претставува добра дијагностичка алатка во детекција на абнормални цервикални лезии. Тестирањето е неопходно да се **инкорпорира** во менаџментот на HPV-позитивните пациентки со цел да се избегнат непотребни упатувања на колпоскопија. Во нашата анализа, високата специфичност укажува дека тестот е особено ефикасен во селекција на пациентки со вистински високоризични лезии, со што значително се намалува бројот на лажно позитивни резултати. Со тоа директно се редуцираат непотребните упатувања на колпоскопија и изведувањето биопсии кај пациентки со низок ризик.

p16/Ki-67 Dual staining овозможува прецизно детектирање на ризикот преку идентификување на жени кај кои веќе постои **биолошка клеточна трансформација, а не само присуство на HPV инфекција**. Со p16/Ki-67 Dual staining дијагностичкиот тест се намалуваат непотребните инвазивни дијагностички процедури. Ваквата дијагностичка анализа директно придонесува кон намалување на непотребните упатувања на колпоскопија и изведување биопсии кај жени со низок ризик, со што се избегнува дополнителен психолошки товар кај пациентките, потенцијални компликации и здравствено-економски трошоци. Следствено, **интеграцијата** на оваа метода во тријажните стратегии претставува рационален, оправдан чекор кон попрецизна, персонализирана и економски одржлива грижа за пациентките со цел намалување на упатувања на колпоскопија и изведувањето биопсии.

ЗАКЛУЧОК

Врз основа на резултатите добиени од спроведеното истражување може да се заклучи дека современиот пристап во скринингот и тријажата на цервикалните интраепителни лезии мора да биде мултимодален, со интеграција на **вирусолошки, морфолошки и биолошки маркери**. Нашата студија, која опфати 145 пациентки кај кои беа изведени LBC цитологија, HPV генотипизација и имуноцитохемиско двојно боење p16/Ki-67, обезбеди јасна слика за компаративната дијагностичка вредност на секоја од овие методи и нивната комбинирана употреба.

Цитологијата (LBC) покажа умерена дијагностичка валидност, со сензитивност од 50% и специфичност од 83.33% за детекција на CIN2+ лезии. Овие резултати ја потврдуваат нејзината ограничена способност за самостојна детекција на сите високоградусни лезии, но и релативно добра способност за исклучување на болеста. Ниската сензитивност укажува дека значителен дел од лезиите од висок градус може да останат недетектирани доколку се користи само цитологија како примарен метод.

HPV генотипизацијата, особено детекцијата на **HPV16/18**, покажа подобра дискриминаторска способност во однос на цитологијата. Комбинираната HPV16/18 генотипизација демонстрираше AUC од 0.732, со сензитивност од 60.98% и специфичност од 85.44%, што укажува на значајна клиничка вредност во стратификацијата на ризикот. HPV16 како поединечен генотип имаше највисока индивидуална дискриминаторска моќ меѓу анализираните типови, додека останатите високоризични генотипови покажаа пониска сензитивност кога се користат самостојно. Овие податоци ја потврдуваат улогата на HPV генотипизацијата како ефективна тријажна алатка, но не и како единствен скрининг тест.

Имуноцитохемиското двојно боење p16/Ki-67 се покажа како важен биолошки маркер на клеточна трансформација. Во нашата студија, dual staining демонстрираше AUC од 0.759, со сензитивност од 58.5% и висока специфичност од

93.2%. Високата специфичност и позитивна предиктивна вредност (77.4%) укажуваат дека тестот има особена вредност во идентификување на пациентки со вистински лезии од висок градус и во намалување на лажно позитивните резултати. Иако сензитивноста е пониска од некои мета-аналитички податоци, ваквиот профил на тестот го прави особено погоден како секундарна тријажа кај HPV-позитивни жени, каде примарната цел е намалување на непотребните колпоскопски упатувања.

Најзначајниот наод од нашето истражување е изразениот синергистички ефект на комбинираниите алгоритми. Тројната комбинација (Цитологија + HPV + p16/Ki-67) постигна AUC од 0.870, што претставува многу добра дијагностичка точност. Комбинацијата HPV + p16/Ki-67 исто така покажа висока дискриминаторска способност (AUC=0.843), додека Цитологија + p16/Ki-67 имаше AUC од 0.791. Овие резултати јасно укажуваат дека **интеграцијата на повеќе биомаркери** значително ја подобрува способноста за разграничување на нискоризични од високоризични лезии во споредба со поединечна метода. Комбинираниот пристап обезбедува оптимален баланс помеѓу сензитивност и специфичност, што е клучно во организирани скрининг програми.

Дополнително, студијата идентификува значајни клинички и демографски корелации. Лезиите од висок градус (CIN2+) се почести кај пациентки постари од 40 години, а просечната возраст прогресивно се зголемува со тежината на лезијата, што ја рефлектира природната историја на HPV инфекцијата и акумулацијата на молекуларни оштетувања со текот на времето. Пушачите имаа значително повисока фреквенција на CIN2+ во споредба со непушачите, што дополнително ја потврдува улогата на пушењето како независен ризик-фактор. Невакцинираните пациентки сигнификантно почесто имаа CIN2+ лезии, додека кај вакцинираните не е регистриран ниту еден случај на лезија од висок градус, што ја потврдува силната протективна улога на HPV вакцинацијата. Дополнително, ко-инфекциите со *Chlamydia trachomatis* и *Ureaplasma urealyticum* беа почести кај HPV16/18 позитивните пациентки, што укажува на можна улога на вагиналната микросредина во перзистенцијата и прогресијата на инфекцијата.

Хистолошки верифицирана CIN2+ беше детектирана кај 28.47% од HPV-позитивните пациентки, што е во согласност со современите европски и светски податоци. Овој наод ја нагласува важноста на правилната тријажа со цел рана детекција на клинички релевантни лезии и превенција на прогресија кон инвазивен карцином.

Севкупно, резултатите од нашата студија ја потврдуваат клиничката оправданост на **интеграцијата на p16/Ki-67 dual staining** во алгоритмите за тријажа кај HPV-позитивни жени. Додека HPV тестирањето обезбедува висока сензитивност за детекција на потенцијално ризични инфекции, p16/Ki-67 овозможува проценка на биолошката активност и клеточната трансформација, со што се идентификуваат пациентките со реален ризик за прогресија. Комбинацијата на овие методи резултира со значително подобрена дијагностичка точност, намалување на непотребните колпоскопии и биопсии, минимизирање на психолошкиот и економскиот товар и оптимизација на здравствените ресурси.

Оттука, може да се заклучи дека **мултимодалниот пристап** кој ги комбинира цитологијата, HPV генотипизацијата и p16/Ki-67 dual staining претставува современа, научно оправдана и клинички ефикасна стратегија за рана детекција и правилна стратификација на ризик кај пациентките со цервикални интраепителни лезии, со потенцијал за значајно подобрување на исходот и намалување на инциденцата на инвазивен карцином на грлото на матката.

Нашите резултати за евалуацијата на клиничката вредност на p16/Ki-67 dual staining како тријажна метода јасно демонстрираат дека најголемата предност на овој тест лежи во неговата способност да детектира биолошка клеточна трансформација, а не само присуство на вирус. Додека HPV тестирањето идентификува вирусолошки ризик, **p16/Ki-67 ја проценува реалната онкогена активност** на инфекцијата преку коекспресија на маркер на клеточна супресија (p16) и маркер на пролиферација (Ki-67) во иста клетка. Ова претставува директен доказ за дерегулација на клеточниот циклус предизвикана од онкоген HPV вирус. Токму оваа биолошка специфичност објаснува зошто во нашата студија dual

staining покажа висока специфичност (93.2%) и висока позитивна предиктивна вредност (77.4%). Со тоа, тестот овозможува:

- Прецизна селекција на пациентки со вистински високоризични лезии.
- Намалување на лажно позитивни резултати.
- Намалување на непотребни колпоскопии и биопсии
- Рационално користење на здравствените ресурси
- Намалување на психолошкиот товар кај пациентките

Особено значајно е што комбинацијата HPV + p16/Ki-67 значително ја подобрува дискриминаторската моќ (AUC=0.843), а тројниот алгоритам достигнува AUC=0.870, што претставува многу висока дијагностичка точност. Овие резултати потврдуваат дека p16/Ki-67 не треба да се гледа како замена за HPV тестирањето и цитологијата, туку како комплементарна и клучна алатка во тријажниот алгоритам. Со оглед на високата специфичност, добрата дискриминаторска способност и способноста за идентификација на клинички релевантни инфекции, p16/Ki-67 dual staining претставува суштинска алатка за современа, персонализирана и економски одржлива стратегија во менаџментот на HPV-позитивни пациентки.

Оттука, резултатите од ова истражување ја потврдуваат оправданоста за интеграција на p16/Ki-67 dual staining во организирани тријажни програми, каде тестот може да има клучна улога во подобрување на клиничките исходи, намалување на непотребните инвазивни интервенции и оптимизација на грижата за женското здравје.

КЛИНИЧКА АПЛИКАТИВНА ДЕЈНОСТ НА P16/KI-67 DUAL STAINING

p16/Ki-67 dual staining претставува клинички применлива, биолошки оправдана и здравствено-економски рационална тријажна метода. Неговата најголема предност е способноста да ја идентификува активната клеточна трансформација, со што обезбедува висока специфичност и сигурна селекција на пациентки со реален ризик за CIN2+ лезии. Во современите скрининг алгоритми, p16/Ki-67 не е замена за HPV тестирањето и цитологијата, туку негова клучна тријажна комплементарна алатка, која значително ја подобрува клиничката одлука и придонесува кон поефикасна, побезбедна и попрецизна грижа за женското здравје.

Имуноцитохемиското двојно боене p16/Ki-67 претставува значаен напредок во современата дијагностика на цервикалните преканцерозни лезии, бидејќи ја премостува празнината помеѓу детекцијата на вирусот (HPV тестирање) и морфолошката проценка (цитологија). Неговата клиничка вредност произлегува од фактот што не детектира само присуство на HPV инфекција, туку ја идентификува биолошката трансформација на клетката, процесот кој е суштински за прогресија кон CIN2+ и инвазивен карцином.

Во клиничка пракса, ова значи дека кај HPV-позитивна пациентка со нормална или цитологија која одговара на LSIL, позитивен p16/Ki-67 резултат ќе биде индикатор за итна колпоскопска евалуација односно биопсија, додека негативен резултат овозможува безбедно следење со одложена контрола.

Една од најголемите клинички дилеми претставува разграничување на транзиторна од перзистентна инфекција:

- транзиторна HPV инфекција (која спонтано регресира),
- перзистентна инфекција со трансформациски потенцијал.

HPV тестирањето не може да направи ваква биолошка дистинкција. p16/Ki-67, преку коекспресија на супресорниот протеин p16 и пролиферативниот маркер Ki-67 во иста клетка, сигнализира дерегулација на клеточниот циклус предизвикана од онкогената активност на вирусот. Со тоа тестот функционира како

„функционален маркер на трансформација“, а не само како индикатор на вирусна присутност.

Од клиничко-организациски аспект, имплементацијата на p16/Ki-67 во тријажните алгоритми има значајни здравствено-економски придобивки намалување на непотребни интервенции:

- Намалување на бројот на колпоскопии кај нискоризични пациентки
- Намалување на бројот на биопсии
- Намалување на прекумерна дијагностика и непотребен третман
- Намалување на психолошкиот стрес кај пациентките

Особено е важно во популации со висока HPV преваленца (млади жени <30 години), каде специфичноста на HPV тестот е пониска.

Во клиничка пракса, голем предизвик претставуваат пациентките со ASC-US и LSIL на цитологијата, овие пациенти често водат до дополнителни дијагностички процедури, иако значителен дел од лезиите регресираат. p16/Ki-67 dual staining покажува особена вредност токму во оваа група, бидејќи:

- Идентификува кои LSIL/ASC-US случаи имаат висок ризик за CIN2+
- Овозможува безбедно следење на негативните случаи

Најголемата клиничка вредност на p16/Ki-67 се постигнува кога се користи во комбинација со: HPV генотипизација (вирусолошка проценка), Цитологија (морфолошка проценка). Комбинираниот пристап обезбедува висока сензитивност преку HPV, висока специфичност преку p16/Ki-67 и морфолошка потврда преку цитологија.

ОГРАНИЧУВАЊЕ НА СТУДИЈАТА

Иако резултатите од оваа студија се охрабрувачки, постојат одредени ограничувања кои треба да се имаат во предвид. Студијата е спроведена на ограничен број пациентки и во специфична популација, што ја намалува можноста за генерализирање на резултатите на пошироката популација.

Краткиот период на следење го ограничува оценувањето на долгорочната прогноза и ризикот од рецидив по третман на CIN2+ лезии. Дополнително, интерпретацијата на p16/Ki-67 dual staining зависи од експертска евалуација, што може да воведо варијабилност помеѓу различните лаборатории.

Ограничени се и податоците за посттерапевтски мониторинг и долгорочно следење на пациентките, како и за економската исплатливост и влијанието на тестот во национални скрининг програми. Сепак, овие ограничувања не го намалуваат значењето на тестот p16/Ki-67 како иновативен и клинички значаен алат за персонализирана грижа во гинеколошката онкологија.

ИДНИ ПЕРСПЕКТИВИ

p16/Ki-67 dual staining претставува чекор кон персонализирана медицина во гинеколошката онкологија. Наместо униформен пристап за сите HPV-позитивни пациентки, тестот овозможува индивидуализирана проценка на ризик и персонализиран план за следење. Во иднина, неговата интеграција во организирани национални скрининг програми може значајно да придонесе кон намалување на инциденцата на инвазивен карцином на грлото на матката, со подобра оптимизација на здравствените ресурси.

Употребата на двојното боење за следење на пациентки по третман за CIN2+ лезија, каде тестот може да има особена вредност во рана детекција на резидуална или рекурентна болест. Во посттерапевтскиот период, разликувањето помеѓу транзиторна HPV перзистенција и вистинска биолошка активност на лезијата е од суштинско значење. Позитивен p16/Ki-67 резултат по третман може да укаже на зголемен ризик за перзистенција или рецидив, додека негативен резултат обезбедува дополнителна сигурност за успешноста на терапијата и овозможува рационално продолжување на следењето.

Подобра комуникација со пациентките за реалниот ризик, бидејќи тестот овозможува јасен приказ дали се работи само за присутна HPV инфекција или за активен процес на клеточна трансформација. Ова придонесува за намалување на анксиозноста, подобра информираност и поголема усогласеност со препорачаните контроли.

РЕФЕРЕНТНА ЛИТЕРАТУРА

1. Wei, Feixue et al. Causal attribution of human papillomavirus genotypes to invasive cervical cancer worldwide: a systematic analysis of the global literature *The Lancet*, Volume 404, Issue 10451, 435 – 444 3,2024
2. Singh D, Vignat J, Lorenzoni V, Eslahi M, Ginsburg O, Lauby-Secretan B, Arbyn M, Basu P, Bray F, Vaccarella S. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative. *Lancet Glob Health*. 2023 Feb;11(2):e197-e206. doi: 10.1016/S2214-109X(22)00501-0. Epub 2022 Dec 14. PMID: 36528031; PMCID: PMC9848409.
3. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. Geneva: World Health Organization; 2020 (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240014107>).
4. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002; 55: 244-265.
5. Wei F, Georges D, Man I, Baussano I, Clifford GM. Causal attribution of human papillomavirus genotypes to invasive cervical cancer worldwide: a systematic analysis of the global literature. *Lancet*. 2024; 404(10451): 435-444.
6. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999; 180: 1415-1423.
7. Lycke KD, Steben M, Garland SM, et al. An updated understanding of the natural history of cervical human papillomavirus infection—clinical implications. *Am J Obstet Gynecol*. 2025; 232(5): 453-460. doi:10.1016/j.ajog.2025.02.029
8. <https://www.iarc.who.int/>
9. Lei M, Zhao C, Zhao Y, Li J, Wei L. Immunogenicity, safety and efficacy of human papillomavirus vaccine: data from China. *Front Immunol*. 2024; 14:1112750.

10. Neerja Bhatla, Daisuke Aoki, Daya Nand Sharma, Rengaswamy Sankaranarayanan, Cancer of the cervix uteri: 09.2025
11. Ginsburg O Bray, F Coleman MP et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *Lancet*. 2017; 389: 847-860
12. <https://www.cancer.org/cancer/acs-medical-content-and-news-staff.html>
13. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/country-profiles/cervical-cancer/cervical-cancer-mkd-2021-country-profile-en.pdf?sfvrsn=27b124a6_38&download=true
14. WHO. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. Geneva: World Health Organization, 2020
15. Cibula D, Raspollini MR, Planchamp F, Centeno C, Chargari C, Felix A, Fischerová D, Jahnn-Kuch D, Joly F, Kohler C, Lax S, Lorusso D, Mahantshetty U, Mathevet P, Naik R, Nout RA, Oaknin A, Peccatori F, Persson J, Querleu D, Bernabé SR, Schmid MP, Stepanyan A, Svintsitskyi V, Tamussino K, Zapardiel I, Lindegaard J. ESGO/ESTRO/ESP Guidelines for the management of patients with cervical cancer - Update 2023. *Int J Gynecol Cancer*. 2023 May 1;33(5):649-666. doi: 10.1136/ijgc-2023-004429. PMID: 37127326; PMCID: PMC10176411.
16. Key Statistics for Cervical Cancer <https://www.cancer.gov/types/cervical/causes-risk-prevention>
17. Castle, P.E.; Stoler, M.H.; Wright, T.C., Jr.; Sharma, A.; Wright, T.L.; Behrens, C.M. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: A subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol*. 2011, 12, 880–890
18. Dijkstra, M.G.; van Niekerk, D.; Rijkaart, D.C.; van Kemenade, F.J.; Heideman, D.A.; Snijders, P.J.; Meijer, C.J.; Berkhof, J. Primary hrHPV DNA testing in cervical cancer screening: How to manage screen-positive women? A POBASCAM trial substudy. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. 2014, 23, 55–63
19. Pirtea L, Secosan C, Margan M, Moleriu L, Balint O, Grigoras D, Sas I, Horhat F, Jianu A, Iliana R. p16/Ki-67 dual staining has a better accuracy than human papillomavirus

(HPV) testing in women with abnormal cytology under 30 years old. *Bosn J Basic Med Sci.* 2019 Nov 8;19(4):336-341. doi: 10.17305/bjbms.2018.3560. PMID: 29924960; PMCID: PMC6868483.

20. Cervical cancer <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>

21. 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;59:6132–6.

22. Pathak P, Pajai S, Kesharwani H. A Review on the Use of the HPV Vaccine in the Prevention of Cervical Cancer. *Cureus.* 2022 Sep 2;14(9):e28710. doi: 10.7759/cureus.28710. PMID: 36211088; PMCID: PMC9529156.

23. Bhatla N, Berek JS, Cuello Fredes M, et al. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 2019; 145: 129-135. Corrigendum in: *Int J Gynecol Obstet.* 2019;147:279–280.

24. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri: 2025 update. *Int J Gynecol Obstet.* 2025; 171(Suppl. 1): 87-108. doi:10.1002/ijgo.70277

25. Yasuda M, Katoh T, Miyama Y, Honma T, Yano M, Yabuno A. Histological classification of uterine cervical adenocarcinomas: Its alteration and current status. *J Obstet Gynaecol Res.* 2025; 51(4):e16287. <https://doi.org/10.1111/jog.16287>

26. Lou J., Guo F. The characteristics of high-risk HPV-negative cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Front. Oncol.* 2024;14:1452834. doi: 10.3389/fonc.2024.1452834. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list]

27. Schreiberhuber L., Barrett J.E., Wang J., Redl E., Herzog C., Vavourakis C.D., Sundström K., Dillner J., Widschwendter M. Cervical cancer screening using DNA methylation triage in a real-world population. *Nat. Med.* 2024;30:2251–2257. doi: 10.1038/s41591-024-03014-6. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list]

28. He J., Tu L., Weng G., Zeng L. Analysis of the differences between HPV-independent and HPV-related cervical adenocarcinoma. *Front. Oncol.* 2025;15:1544207. doi: 10.3389/fonc.2025.1544207. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list]
29. Saglam O, Conejo-Garcia J. PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in advanced cervical cancer. *Integr Cancer Sci Ther.* 2018;5(2):10.15761/ICST.1000272. doi: 10.15761/ICST.1000272. Epub 2018 Apr 14. PMID: 29955379; PMCID: PMC6016855.
30. Prognostic Role Of PD-L1 Expression In Cervical Cancer Palaia, Innocenza et al. *International Journal of Gynecological Cancer*, Volume 35, Issue 2, 100594 February 2025
- 31 Peng-Hui Luo et al. Predicted Value of PD-L1 for Patients With Cervical Cancer Treated With Pembrolizumab. *J Clin Oncol* 42, 1596-1596(2024). DOI:10.1200/JCO.23.02479
- 32 Lei M, Zhao C, Zhao Y, Li J, Wei L. Immunogenicity, safety and efficacy of human papillomavirus vaccine: data from China. *Front Immunol.* 2024; 14:1112750.
33. https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/by-disease/hpv.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fvaccines%2Fvpd%2Fhpv%2Fhcp%2Frecommendations.html
34. Petrosky E, Bocchini JA Jr, Hariri S, Chesson H, Curtis CR, Saraiya M, Unger ER, Markowitz LE; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015 Mar 27;64(11):300-4. PMID: 25811679; PMCID:PMC4584883.
35. Joura, Elmar A. et al. Human papillomavirus vaccination: The ESGO–EFC position paper of the European society of Gynaecologic Oncology and the European Federation for colposcopy, *European Journal of Cancer*, Volume 116, 21 – 26, 2019
36. McLean HQ, VanWormer JJ, Chow BDW, Birchmeier B, Vickers E, DeVries E, Meyer J, Moore J, McNeil MM, Stokley S, Gee J, Belongia EA. Improving Human

Papillomavirus Vaccine Use in an Integrated Health System: Impact of a Provider and Staff Intervention. *J Adolesc Health*. 2017 Aug;61(2):252-258. doi: 10.1016/j.jadohealth.2017.02.019. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28462786; PMCID: PMC6749828.

37. Maver PJ, Poljak M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clin Microbiol Infect*. 2020 May;26(5):579-583. doi: 10.1016/j.cmi.2019.09.006. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31539637.

38. Jeong H, Hong SR, Chae SW, Jin SY, Yoon HK, Lee J, Kim EK, Ha ST, Kim SN, Park EJ, Jung JJ, Sung SH, Lim SC. Comparison of Unsatisfactory Samples from Conventional Smear versus Liquid-Based Cytology in Uterine Cervical Cancer Screening Test. *J Pathol Transl Med*. 2017 May;51(3):314-319. doi: 10.4132/jptm.2017.03.17. Epub 2017 Apr 17. PMID: 28415159; PMCID: PMC5445207.

39. Nayar R, Wilbur DC. The Pap Test and Bethesda 2014: "The reports of my demise have been greatly exaggerated. (after a quotation from Mark Twain)". *J Low Genit Tract Dis*. 2015 Jul;19(3):175-84. doi: 10.1097/LGT.000000000000115. PMID: 25943863.

40. Bruni L, Serrano B, Roura E, et al. Cervical cancer screening programmes and age-specific coverage estimates for 202 countries and territories worldwide: a review and synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2022; 10(8): E1115-!1127.

41. Maver PJ, Poljak M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26: 579-583.

42. World Health Organization. WHO Guidelines for the Use of Thermal Ablation for Cervical Pre-Cancer Lesions. WHO; 2019. Accessed May 2, 2021.

43. Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, Coupe VM, Hesselink AT, Rozendaal L, Heideman DA, Verheijen RH, Bulk S, Verweij WM, Snijders PJ, Meijer CJ. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer*. 2012 Feb 1;130(3):602-10. doi: 10.1002/ijc.26056. Epub 2011 May 5. PMID: 21400507.

44. Feldstein O, Gali-Zamir H, Schejter E, Feinberg T, Yehuda-Shnaidman E, Bornstein J, Levy T. High-risk HPV testing vs liquid-based cytology for cervical cancer screening among 25- to 30-year-old women: A historical cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2023 Feb;102(2):226-233. doi: 10.1111/aogs.14482. Epub 2022 Dec 7. PMID: 36478537; PMCID: PMC9889323.
45. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition
(<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/342365/9789240030824-eng.pdf?sequence=1>)
46. U.S. Preventive Services Task Force Draft Recommendation Statement: Cervical Cancer Screening. [(accessed on 10 December 2024)]. Available online: <https://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf/draft-recommendation/cervical-cancer-screening-adults-adolescents>.
47. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology New ASCCP Cervical Cancer Management Guidelines Now Include Dual-Stain Triage Testing. [(accessed on 11 March 2024)]. Available online: <https://www.asccp.org/clinical-practice/guidelines/screening-guidelines>.
48. . Kyrgiou, M., Arbyn, M., Bergeron, C. et al. Cervical screening: ESGO-EFC position paper of the European Society of Gynaecologic Oncology (ESGO) and the European Federation of Colposcopy (EFC). *Br J Cancer* 123, 510–517 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0920-9>
49. Arbyn, M., Ronco, G., Anttila, A., Meijer, C. J., Poljak, M., Ogilvie, G. et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 30, F88–F99 (2012).
50. Ogilvie, G. S., van Niekerk, D., Krajden, M., Smith, L. W., Cook, D., Gondara, L. et al. Effect of screening with primary cervical HPV testing vs cytology testing on highgrade cervical intraepithelial neoplasia at 48 months: the HPV FOCAL Randomized Clinical Trial. *JAMA* 320, 43–52 (2018).

51. Yu L, Fei L, Liu X, Pi X, Wang L, Chen S. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *J Cancer* 2019; 10(12):2654-2660. doi:10.7150/jca.32743. <https://www.jcancer.org/v10p2654.htm>.
52. Kituncharoen S, Tantbirojn P, Niruthisard S. Comparison of Unsatisfactory Rates and Detection of Abnormal Cervical Cytology Between Conventional Papanicolaou Smear and Liquid-Based Cytology (Sure Path®). *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(18):8491-4. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.18.8491. PMID: 26745107.
53. Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, Coupe VM, Hesselink AT, Rozendaal L, Heideman DA, Verheijen RH, Bulk S, Verweij WM, Snijders PJ, Meijer CJ. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer.* 2012 Feb 1;130(3):602-10. doi: 10.1002/ijc.26056. Epub 2011 May 5. PMID: 21400507.
54. Katki HA, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, Lorey T, Cheung LC, Raine-Bennett T, Gage JC, Kinney WK. Benchmarking CIN 3+ risk as the basis for incorporating HPV and Pap cotesting into cervical screening and management guidelines. *J Low Genit Tract Dis.* 2013 Apr;17(5 Suppl 1):S28-35. doi: 10.1097/LGT.0b013e318285423c. PMID: 23519302; PMCID: PMC3616419
55. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, Solomon D, Wentzensen N, Lawson HW; 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol.* 2013 Apr;121(4):829-846. doi: 10.1097/AOG.0b013e3182883a34. PMID: 23635684.
56. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol.* 2015 Feb;136(2):189-97. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.11.076. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25579108.
57. Ronco, G., Arbyn, M., Meijer, C. J. L. M., Snijders, P. J. F., Cuzick, J. Screening for Cervical Cancer with Primary Testing for Human Papillomavirus (Supplement 1), 2nd edn (Office for Official Publications of the European Union, Luxembourg,

2015)

58. Chinchai, Teeraporn et al. Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Cancer International Journal of Gynecological Cancer, Volume 22, Issue 6, 1063 – 1068 06,2012

59. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, Allen RA, Zhang R, Dunn ST, Walker JL, Schiffman M. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. Clin Cancer Res. 2012 Aug 1;18(15):4154-62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0270. Epub 2012 Jun 6. PMID: 22675168; PMCID: PMC4237612.

60. Clarke MA, Wentzensen N, Perkins RB, Garcia F, Arrindell D, Chelmow D, Cheung LC, Darragh TM, Egemen D, Guido R, Huh W, Locke A, Lorey TS, Nayar R, Risley C, Saslow D, Smith RA, Unger ER, Massad LS; Enduring Consensus Cervical Cancer Screening and Management Guidelines Committee. Recommendations for Use of p16/Ki67 Dual Stain for Management of Individuals Testing Positive for Human Papillomavirus. J Low Genit Tract Dis. 2024 Apr 1;28(2):124-130. doi: 10.1097/LGT.0000000000000802. Epub 2024 Mar 2. Erratum in: J Low Genit Tract Dis. 2024 Jul 1;28(3):316. doi: 10.1097/LGT.0000000000000825. PMID: 38446575; PMCID: PMC11331430.

61. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P190024>

62. Harper DM, Paczos T, Ridder R, Huh WK. p16/ki-67 dual stain triage of individuals positive for HPV to detect cervical precancerous lesions. Int J Cancer. 2025 Jun 15;156(12):2257-2264. doi: 10.1002/ijc.35353. Epub 2025 Feb 4. PMID: 39901857; PMCID: PMC12008826.

63. Dovnik A, Repše Fokter A. The Role of p16/Ki67 Dual Staining in Cervical Cancer Screening. Curr Issues Mol Biol. 2023 Oct 19;45(10):8476-8491. doi: 10.3390/cimb45100534. PMID: 37886977; PMCID: PMC10605736.

64. Liu, J., Su, S. & Liu, Y. The value of Ki67 for the diagnosis of LSIL and the problems of p16 in the diagnosis of HSIL. Sci Rep 12, 7613 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11584-z>

65. Yu L, Chen X, Liu X, Fei L, Ma H, Tian T, Wang L and Chen S (2022) Significance of Triple Detection of p16/ki-67 Dual-Staining, Liquid-Based Cytology and HR HPV Testing in Screening of Cervical Cancer: A Retrospective Study. *Front. Oncol.* 12:915418. doi: 10.3389/fonc.2022.915418
66. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R; PALMS Study Group. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Oct 16;105(20):1550-7. doi: 10.1093/jnci/djt235. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24096620; PMCID: PMC3814411.
67. Tay TKY, Lim KL, Hilmy MH, Thike AA, Goh ST, Song LH, Hwang JSG, Mantoo S. Comparison of the sensitivity and specificity of p16/Ki-67 dual staining and HPV DNA testing of abnormal cervical cytology in the detection of histology proven cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and above (CIN 2+). *Malays J Pathol.* 2017 Dec;39(3):257-265. PMID: 29279588.
68. World Health Organization. WHO Guideline for Screening and Treatment of Cervical Pre-Cancer Lesions for Cervical Cancer Prevention. 2nd ed. WHO; 2021. Accessed December 21, 2024.
69. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, Tokugawa D, Bodelon C, Poitras N, Lorey T, Kinney W. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Sep 15;107(12):djv257. doi: 10.1093/jnci/djv257. PMID: 26376685; PMCID: PMC4675094.
70. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, Kommos F, Löning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol.* 2011 Jun 1;121(3):505-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.02.033. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21420158.
71. Yu LL, Chen W, Lei XQ, Qin Y, Wu ZN, Pan QJ, Zhang X, Chang BF, Zhang SK, Guo HQ, Qiao YL. Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in detection of cervical

precancer and cancers: a multicenter study in China. *Oncotarget*. 2016 Apr 19;7(16):21181-9. doi: 10.18632/oncotarget.8307. PMID: 27029033; PMCID: PMC5008277.

72. Qin Han, Hongyan Guo,* Li Geng, and Yanjie Wang, p16/Ki-67 dual-stained cytology used for triage in cervical cancer opportunistic screening, *Chin J Cancer Res*. 2020 Apr; 32(2): 208–217.doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2020.02.08

73. Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*. 2002;38:2229–42.

74. Ebisch, R., van der Horst, J., Hermsen, M. *et al*. Evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology as triage test for high-risk human papillomavirus-positive women. *Mod Pathol* **30**, 1021–1031 (2017). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.16>

75. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Oct;17(10):2536-45. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0306. PMID: 18842994; PMCID: PMC2900792.

76. Kalof AN, Cooper K. p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol*. 2006 Jul;13(4):190-4. doi: 10.1097/00125480-200607000-00006. PMID: 16858153.

77. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta*. 2019 Apr;491:39-45. doi: 10.1016/j.cca.2019.01.011. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30653951.

78. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD. *et al*. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993;123:513–22.

79. Megan A. Clarke, PhD, MHS; Li C. Cheung, PhD; Philip E. Castle, PhD, MPH; Mark Schiffman, MD, MPH; Diane Tokugawa, MD; Nancy Poitras, BS; Thomas Lorey, MD; Walter Kinney, MD; Nicolas Wentzensen, MD, PhD, MS, Five-Year Risk of Cervical Precancer Following p16/Ki-67 Dual-Stain Triage of HPV-Positive Women, *JAMA Oncol.* 2019;5(2):181-186. doi:10.1001/jamaoncol.2018.4270
80. Silva DC, Gonçalves AK, Cobucci RN, Mendonça RC, Lima PH, Cavalcanti G Júnior. Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions - A systematic review. *Pathol Res Pract.* 2017 Jul;213(7):723-729. doi: 10.1016/j.prp.2017.03.003. Epub 2017 Mar 14. PMID: 28554769.
81. Thomas C. Wright Jr, Mark H. Stoler, Jim Ranger-Moore, Qijun Fang, Patrick Volkir, Mahboobeh Safaeian, Ruediger Ridder, Clinical validation of p16/Ki-67 dual-stained cytology triage of HPV-positive women: Results from the IMPACT trial, *International Journal of Cancer* First published: 18 September 2021 <https://doi.org/10.1002/ijc.33812>Citations
82. Luttmer, R., Dijkstra, M., Snijders, P. et al. p16/Ki-67 dual-stained cytology for detecting cervical (pre)cancer in a HPV-positive gynecologic outpatient population. *Mod Pathol* 29, 870–878 (2016). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.80>
83. Areán-Cuns C, Mercado-Gutiérrez M, Paniello-Alastruey I, Mallor-Giménez F, Córdoba-Iturriagoitia A, Lozano-Escario M, Santamaria-Martínez M. Dual staining for p16/Ki67 is a more specific test than cytology for triage of HPV-positive women. *Virchows Arch.* 2018 Nov;473(5):599-606. doi: 10.1007/s00428-018-2432-z. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30094492.
84. Hammer A, Gustafson LW, Christensen PN, Brøndum R, Andersen B, Andersen RH, Tranberg M. Implementation of p16/Ki67 dual stain cytology in a Danish routine screening laboratory: Importance of adequate training and experience. *Cancer Med.* 2020 Nov;9(21):8235-8242. doi: 10.1002/cam4.3399. Epub 2020 Sep 7. PMID: 32894896; PMCID: PMC7643653.
85. Trzeszcz M, Mazurec M, Jach R, Mazurec K, Jach Z, Kotkowska-Szeps I, Kania M, Wantuchowicz M, Prokopyk A, Barcikowski P, Przybylski M, Wach J, Halon A. Is Primary HPV with Secondary p16/Ki67 Dual-Stain an Alternative HSIL-Risk Detection

Strategy in Cervical Cancer Screening for Women under 30 Years? *Diagnostics* (Basel). 2021 Oct 29;11(11):2012. doi: 10.3390/diagnostics11112012. PMID: 34829358; PMCID: PMC8624363.

86. Weerakkody Y, Knipe H, Hacking C, et al. WHO classification of tumours of the uterine cervix (5th edition). Reference article, Radiopaedia.org Mar 2025 <https://doi.org/10.53347/rID-17954>

87. White C, Bakhiet S, Bates M, Keegan H, Pilkington L, Ruttle C, Sharp L, O' Toole S, Fitzpatrick M, Flannelly G, O' Leary JJ, Martin CM. Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. *Cytopathology*. 2016 Aug;27(4):269-76. doi: 10.1111/cyt.12317. Epub 2016 Mar 1. PMID: 26932360.

88. Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J, Louwers JA, Nobbenhuis MA, Bais AG, Hogewoning CJ, Zaal A, Verheijen RH, Snijders PJ, Meijer CJ. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. *Lancet Oncol*. 2011 May;12(5):441-50. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70078-X. PMID: 21530398.

89. Polman NJ, Uijterwaal MH, Witte BI, Berkhof J, van Kemenade FJ, Spruijt JW, van Baal WM, Graziosi PG, van Dijken DK, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Steenberg RD, Heideman DA, Ridder R, Snijders PJ, Meijer CJ. Good performance of p16/ki-67 dual-stained cytology for surveillance of women treated for high-grade CIN. *Int J Cancer*. 2017 Jan 15;140(2):423-430. doi: 10.1002/ijc.30449. Epub 2016 Oct 11. PMID: 27677098.

90. Ravarino A, Nemolato S, Macciocu E, Frascini M, Senes G, Faa G, Negri G. CINtec PLUS immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri. *Am J Clin Pathol*. 2012 Nov;138(5):652-6. doi: 10.1309/AJCP00INMGIFYFNQ. PMID: 23086765.

91. El-Zein M, Gotlieb W, Gilbert L, Hemmings R, Behr MA, Franco EL; STAIN-IT Study Group. Dual staining for p16/Ki-67 to detect high-grade cervical lesions: Results

from the Screening Triage Ascertaining Intraepithelial Neoplasia by Immunostain Testing study. *Int J Cancer*. 2021 Jan 15;148(2):492-501. doi: 10.1002/ijc.33250. Epub 2020 Aug 24. PMID: 32781481.

92. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, Tokugawa D, Bodelon C, Poitras N, Lorey T, Kinney W. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Sep 15;107(12):djv257. doi: 10.1093/jnci/djv257. PMID: 26376685; PMCID: PMC4675094.

93. Yu LL, Chen W, Lei XQ, Qin Y, Wu ZN, Pan QJ, Zhang X, Chang BF, Zhang SK, Guo HQ, Qiao YL. Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in detection of cervical precancer and cancers: a multicenter study in China. *Oncotarget*. 2016 Apr 19;7(16):21181-9. doi: 10.18632/oncotarget.8307. PMID: 27029033; PMCID: PMC5008277.

94. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. 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. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70158-5. PMID: 17597569.

95. Tanik, Eylul Beren¹; Bakir, Ayfer¹; Turkmenoglu, Tugba Taskin²; Erdem, Gull¹. Distribution of High-risk Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Smear Samples and Evaluation of ASC-US, LSIL, and HSIL Results. *Journal of Cytology* 42(1):p 37-42, January-March 2025. | DOI: 10.4103/joc.joc_70_24

96. Zhong G, Wang Y, Xie Q, Lin R, Yao T. HPV-specific risk assessment of cervical cytological abnormalities. *BMC Cancer*. 2021 Aug 24;21(1):949. doi: 10.1186/s12885-021-08703-w. PMID: 34429079; PMCID: PMC8383360.

97. Liu Q, Chen L, Yu M, Zhou X, Zhang X, Zheng W, Niu S, Zhou F. Prevalence of cervical precancers or cancers in women with ASC-H/HSIL cytology according to Aptima HPV (AHPV) assay-detected HPV genotypes and age. *J Cancer*. 2024 Jan 1;15(1):140-148. doi: 10.7150/jca.89715. PMID: 38164279; PMCID: PMC10751681.

98. Sørbye S, Falang BM, Antonsen M, Mortensen E. Genotype-Specific HPV mRNA Triage Improves CIN2+ Detection Efficiency Compared to Cytology: A Population-Based Study of HPV DNA-Positive Women. *Pathogens*. 2025 Jul 30;14(8):749. doi: 10.3390/pathogens14080749. PMID: 40872259; PMCID: PMC12388914.
99. Li, X., Xiang, F., Zhao, Y. et al. Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions and assessing diagnostic performance of colposcopy among women with oncogenic HPV. *BMC Women's Health* 23, 411 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12905-023-02538-2>
100. He Y, Zhao Q, Geng YN, Yang SL, Yin CH, Wu YM. Clinical analysis of cervical intraepithelial neoplasia with vaginal intraepithelial neoplasia. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Apr;96(17):e6700. doi: 10.1097/MD.00000000000006700. PMID: 28445274; PMCID: PMC5413239.
101. Dai, W., Wang, T., Chen, L. et al. Immediate risk of cervical intraepithelial neoplasia and diagnostic value of colposcopy among cytology-negative women with oncogenic HPV: a retrospective study. *BMC Women's Health* 24, 419 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12905-024-03258-x>
102. Tidy JA, Lyon R, Ellis K, Macdonald M, Palmer JE. The impact of age and high-risk human papillomavirus (hrHPV) status on the prevalence of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+) in women with persistent hrHPV-positive, cytology-negative screening samples: a prospective cohort study. *BJOG*. 2020 Sep;127(10):1260-1267. doi: 10.1111/1471-0528.16250. Epub 2020 May 3. PMID: 32279427.
103. Chen R, Li Y, Li X, Wang X, Lü W, Fu Y. Age-specific 3-year risk of cervical precancer among HPV-positive women attending screening: a post hoc analysis from a retrospective cohort. *Infect Agent Cancer*. 2024 Oct 16;19(1):53. doi: 10.1186/s13027-024-00614-2. PMID: 39415241; PMCID: PMC11481792.
104. Fernanda Villar Fonseca, Maria Victória Gutierrez Cordeiro, Ariadne Cristine Pozza, Carlos Afonso Maestri Cervical Intraepithelial Neoplasia: Analyzing the Disease Present Exclusively in the Endocervical Canal DOI: 10.1055/s-0042-1743102 - volume 44 - Abril 2022

105. Utkowska, W.; Tucka, B.; Szyszkowski, J.; Krasuski, K.; Ludwin, A.; Suchońska, B. Histopathological Verification of Abnormal Cytology Results Suggesting High-Grade Intraepithelial Lesions in Women over 50 Years of Age—Evaluation of the Clinical Utility of Conventional Gynecological Cytology. *J. Clin. Med.* 2025, 14, 8305. <https://doi.org/10.3390/jcm14238305>
106. Rego RM, Vale DB, Campos CS, Vasconcelos L, Campos E, Lima HCL, Discacciati MG, Zeferino LC, Teixeira JC. Age distribution of high-risk HPV infection and cervical lesions in an unvaccinated adult Brazilian population within an organized screening program. *Sci Rep.* 2026 Jan 7;16(1):4453. doi: 10.1038/s41598-025-34501-6. PMID: 41501235; PMCID: PMC12864863.
107. Malevolti, Maria Chiara; Lugo, Alessandrab; Scala, Marcob; Gallus, Silvanob; Gorini, Giuseppea; Lachi, Alessioc; Carreras, GiuliaaDose-risk relationships between cigarette smoking and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis *European Journal of Cancer Prevention* 32(2):p 171-183, March 2023. | DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000773
108. Jouya S, Shahabinia Z, Mazidimoradi A, Allahqoli L, Salehiniya H, Lee DY. Cervical Cancer Epidemiology: Global Incidence, Mortality, Survival, Risk Factors, and Equity in HPV Screening and Vaccination. *J Clin Med.* 2026 Jan 29;15(3):1079. doi: 10.3390/jcm15031079. PMID: 41682759; PMCID: PMC12898345.
109. Feng RM, Hu SY, Zhao FH, Zhang R, Zhang X, Wallach AI, Qiao YL. Role of active and passive smoking in high-risk human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse. *J Gynecol Oncol.* 2017 Sep;28(5):e47. doi: 10.3802/jgo.2017.28.e47. Epub 2017 Mar 24. PMID: 28657217; PMCID: PMC5540715.
110. Mikalsen MP, Simonsen GS, Sørbye SW. Impact of HPV Vaccination on the Incidence of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN2+) in Women Aged 20-25 in the Northern Part of Norway: A 15-Year Study. *Vaccines (Basel).* 2024 Apr 16;12(4):421. doi: 10.3390/vaccines12040421. PMID: 38675803; PMCID: PMC11054067.
111. Bruno, M.T.; Pagana, A.; Lo Giudice, C.; Panella, M.M.; Mascellino, G.; Laganà, A.S. CIN2 in the Era of Risk-Based Management and HPV Vaccination: Epidemiology,

Natural History and Guidelines. *Diagnostics* 2025, 15, 2512.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics15192512>

112. Naldini G, Grisci C, Chiavarini M, Fabiani R. Association between human papillomavirus and chlamydia trachomatis infection risk in women: a systematic review and meta-analysis. *Int J Public Health*. 2019 Jul;64(6):943-955. doi: 10.1007/s00038-019-01261-w. Epub 2019 Jun 8. PMID: 31175391.

113. Chen H, Luo L, Wen Y, He B, Ling H, Shui J, He P, Hou X, Tang S, Li Z. Chlamydia trachomatis and Human Papillomavirus Infection in Women From Southern Hunan Province in China: A Large Observational Study. *Front Microbiol*. 2020 May 5;11:827. doi: 10.3389/fmicb.2020.00827. PMID: 32431682; PMCID: PMC7214719.

114. Ye H, Song T, Zeng X, Li L, Hou M, Xi M. Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2018 Jun;297(6):1377-1387. doi: 10.1007/s00404-018-4733-5. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29520664.

115. Kiguradze E, Skhirtladze T, Chkhartishvili N, Gogoladze T, Chikhladze N, Alibegashvili T. Comparison of cervical cancer screening models based on Pap and HPV tests in Tbilisi, Georgia. *Cent Eur J Public Health*. 2024 Sep;32(3):166-172. doi: 10.21101/cejph.a8014. PMID: 39352091.

116. Cho EH, Park MS, Woo HY, Park H, Kwon MJ. Evaluation of clinical usefulness of HPV-16 and HPV-18 genotyping for cervical cancer screening. *J Gynecol Oncol*. 2024 Nov;35(6):e72. doi: 10.3802/jgo.2024.35.e72. Epub 2024 Mar 15. PMID: 38522949; PMCID: PMC11543248.

117. Vahteristo M, Heinävaara S, Dillner J, Kalliala I, Nieminen P, Sarkeala T, Leinonen MK. Long-term human papillomavirus genotype-specific risk of cervical high-grade intraepithelial lesion and cancer-By age group and triage cytology. *Int J Cancer*. 2026 Feb 15;158(4):931-941. doi: 10.1002/ijc.70123. Epub 2025 Sep 1. PMID: 40888275; PMCID: PMC12712356

118. Zhang H, Dai Y, Zhou H, Yang Y, Pi R, Li T, Zhu L, Chen W. Application of P16/Ki-67 dual-staining for the detection of high-grade cervical lesions in the triage of

patients with minor abnormal cytology: A meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2026 Feb;172(2):815-827. doi: 10.1002/ijgo.70432. Epub 2025 Aug 11. PMID: 40787885.

119. Ouh, Y.-T.; Kim, H.Y.; Yi, K.W.; Lee, N.-W.; Kim, H.-J.; Min, K.-J. Enhancing Cervical Cancer Screening: Review of p16/Ki-67 Dual Staining as a Promising Triage Strategy. *Diagnostics* 2024, 14, 451. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14040451>

120. Han Q, Guo H, Geng L, Wang Y. p16/Ki-67 dual-stained cytology used for triage in cervical cancer opportunistic screening. *Chin J Cancer Res.* 2020 Apr;32(2):208-217. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2020.02.08. PMID: 32410798; PMCID: PMC7219095.

121. Tay TKY, Lim KL, Hilmy MH, Thike AA, Goh ST, Song LH, Hwang JSG, Mantoo S. Comparison of the sensitivity and specificity of p16/Ki-67 dual staining and HPV DNA testing of abnormal cervical cytology in the detection of histology proven cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and above (CIN 2+). *Malays J Pathol.* 2017 Dec;39(3):257-265. PMID: 29279588.

122. Rawan Tahboub, Javier Sanchez-Ortiz, Mia Lai, Jennifer L. Clark, Tianle Zou, Something old, something new: Cervical cytopathology in the new era, *Human Pathology Reports*, Volume 37,2024,300756,ISSN 2772-736X, <https://doi.org/10.1016/j.hpr.2024.300756>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772736X24000288>)

123. Arbyn M, Xu L, Verdoodt F, Cuzick J, Szarewski A, Belinson JL, Wentzensen N, Gage JC, Khan MJ. Genotyping for Human Papillomavirus Types 16 and 18 in Women With Minor Cervical Lesions: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2017 Jan 17;166(2):118-127. doi: 10.7326/M15-2735. Epub 2016 Nov 15. PMID: 27842420.

124. Hashim D, Engesæter B, Baadstrand Skare G, Castle PE, Bjørge T, Tropé A, Nygård M. Real-world data on cervical cancer risk stratification by cytology and HPV genotype to inform the management of HPV-positive women in routine cervical screening. *Br J Cancer.* 2020 May;122(11):1715-1723. doi: 10.1038/s41416-020-0790-1. Epub 2020 Apr 3. PMID: 32242098; PMCID: PMC7250848.

125. Shi, R., Qi, W., Wang, Z. et al. High-risk human papillomavirus genotype distribution and attribution to cervical lesions in a Shanxi Province screening population. *Sci Rep* 15, 28217 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-14228-0>
126. Zhang J, Cheng K, Wang Z. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia in China: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2020 Dec;302(6):1329-1337. doi: 10.1007/s00404-020-05787-w. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32914222; PMCID: PMC7584548.
127. Kirschner B, Schledermann D, Holl K, Rosenlund M, Raillard A, Quint W, Molijn A, Jenkins D, Junge J. HPV-genotypes in high-grade intraepithelial cervical lesions in Danish women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2013 Sep;92(9):1032-40. doi: 10.1111/aogs.12162. Epub 2013 Jun 1. PMID: 23647074.
128. Zhong F, Yu T, Ma X, Wang S, Cong Q, Tao X. Extensive HPV Genotyping Reveals High Association between Multiple Infections and Cervical Lesions in Chinese Women. *Dis Markers.* 2022 Jun 10;2022:8130373. doi: 10.1155/2022/8130373. PMID: 35722626; PMCID: PMC9205720.
129. Sun M, Shen Y, Ren ML, Dong YM. Meta-analysis on the performance of p16/Ki-67 dual immunostaining in detecting high-grade cervical intraepithelial neoplasm. *J Cancer Res Ther.* 2018 Sep;14(Supplement):S587-S593. doi: 10.4103/0973-1482.183216. PMID: 30249873.
130. Peeters E, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. Meta-analysis of the accuracy of p16 or p16/Ki-67 immunocytochemistry versus HPV testing for the detection of CIN2+/CIN3+ in triage of women with minor abnormal cytology. *Cancer Cytopathol.* 2019 Mar;127(3):169-180. doi: 10.1002/ency.22103. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30811902.

131. Zhang H, Dai Y, Zhou H, Yang Y, Pi R, Li T, Zhu L, Chen W. Application of P16/Ki-67 dual-staining for the detection of high-grade cervical lesions in the triage of patients with minor abnormal cytology: A meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2026 Feb;172(2):815-827. doi: 10.1002/ijgo.70432. Epub 2025 Aug 11. PMID: 40787885.
132. Ye C, Liu Y, Huang H, Chen R, Li Y, Zhang X, Fu Y, Feng L, Li X. Risk-Based Triage Strategy by Extended HPV Genotyping for Women With LSIL Cytology: A Real-World Study. *J Med Virol*. 2025 May;97(5):e70404. doi: 10.1002/jmv.70404. PMID: 40392058; PMCID: PMC12090974.
133. Sahin G, Ulu FY, Yuksel IT. Predictive determinants of CIN II + lesions in women over 65 years old: the contribution of HPV, colposcopy, and double immunostaining techniques. *BMC Geriatr*. 2025 Nov 7;25(1):855. doi: 10.1186/s12877-025-06524-1. PMID: 41204121; PMCID: PMC12595797.
134. Aromseree S, Wongjumpa W, Ekalaksananan T, Temtanakitpaisan A, Kleebkaow P, Srisathaporn S, Tongchai P, Pientong C. P16/Ki-67 Dual Staining in Positive Human Papillomavirus DNA Testing for Predictive Diagnosis of Abnormal Cervical Lesions in Northeastern Thai Women. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2022 Oct 1;23(10):3405-3411. doi: 10.31557/APJCP.2022.23.10.3405. PMID: 36308365; PMCID: PMC9924320.
135. Molecular Diagnostics in Human Papillomavirus-Related Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, February 2020 *Cells*9(2):500DOI: 10.3390/cells9020500 License: CC BY 4.0 Katherine C. Wai Madeleine P. Strohl Annemieke, van Zante Patrick K. Ha