

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA,, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ**

**IMPORTANȚA PREVENIRII CANCERULUI
DE COL UTERIN PRIN DEPISTAREA
PRECOCE A INFECȚIEI CU HPV
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. MATEI DUMITRU**

**Student-doctorand:
DINCĂ GABRIELA ADRIANA**

2017

CUPRINS

Introducere

I. Partea generală – Stadiul actual al cunoașterii

1. CANCERUL DE COL UTERIN: EPIDEMIOLOGIE	1
1.1. Aspecte epidemiologice în plan internațional	1
1.2. Incidența cancerului de col uterin	1
1.3. Mortalitatea prin cancerul de col uterin	6
1.4. Cancerul de col uterin, problemă importantă de sănătate publică	8
1.5. Cancerul de col uterin în România	10
2. ISTORIA NATURALĂ A CANCERULUI DE COL UTERIN ..	15
2.1. Anatomia și histologia colului uterin	15
2.2. Neoplazia cervicală intraepitelială	17
2.2.1. Istoria naturală a neoplaziei intraepiteliale cervicale	19
2.2.1.1. Transmiterea infecției HPV	20
2.2.1.2. Caracteristicile Virusului Papilloma Uman (HPV)	20
2.2.1.3. Clasificarea Virusurilor Papillomului Uman	21
2.2.2. Evoluția neoplaziei intraepiteliale cervicale	23
2.2.2.1. Rolul infecției HPV	23
2.2.2.2. Etapele infecției HPV	24
2.2.2.2.1. Inițierea infecției HPV	24
2.2.2.2.2. Faza de menținere a infecției virale	24
2.2.2.2.3. Infecția transformantă	25
2.2.2.2.4. Persistența infecției virale	27
2.2.2.2.5. Consecințele persistenței infecției HPV	28
2.2.3. Patogeneza	28
3. FACTORII DE RISC PENTRU CANCERUL DE COL UTERIN	32
3.1. Infecția HPV	32
3.1.1. Prevalența infecției HPV	32
3.1.2. Prevalența infecției HPV în România	34
3.2. Rolul partenerului masculin	35
3.3. Alte infecții cu transmitere sexuală	37
3.4. Aspecte legate de stilul de viață	38
3.4.1. Aspecte legate de comportamentul sexual	38
3.4.2. Paritatea	39
3.4.3. Contraceptivele orale	39
3.4.4. Fumatul	39
3.4.5. Factori nutriționali	40
3.5. Nivelul socio-economic	40
4. DIAGNOSTICUL CANCERULUI DE COL UTERIN	42
4.1. Anamneza	42

4.2. Examenul clinic	42
4.3. Examenul citologic Babeş-Papanicolaou	43
4.4. Testarea HPV	44
4.5. Imunocitochimia	46
4.6. Colposcopia	48
4.7. Examenul histopatologic	51
4.8. Imunohistochimia	55
4.9. Stadializarea cancerului de col uterin	56

5. PREVENȚIA CANCERULUI DE COL UTERIN 59

5.1. Prevenția primară	59
5.2. Prevenția secundară	63
5.2.1. Screening primar citologic	63
5.2.2. Screening primar prin testarea HPV	65
5.2.3. Triajul frotiurilor cu citologii anormale	67
5.2.3.1. Triajul frotiurilor cu atipii minore	67
5.2.3.2. Triajul frotiurilor cu atipii majore	68
5.2.3.3. Triajul frotiurilor cu atipii glandulare	69
5.2.4. Eficiența screening-ului	69
5.3. Prevenția terțiară	70

II. Contribuții personale

6. OBIECTIVE GENERALE ȘI IPOTEZELE DE LUCRU 71

6.1. Obiectivele generale ale tezei de doctorat	71
6.2. Ipotezele de lucru ale cercetării	72

7. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII 73

7.1. Tipul studiului	73
7.2. Populația de studiu	73
7.2.1. Criteriile de includere	74
7.2.2. Criteriile de excludere	74
7.3. Protocolul de examinare	74
7.3.1. Examinarea clinică	74
7.3.2. Examenul bacteriologic al secreției cervico-vaginale	74
7.3.3. Examenul citologic	75
7.3.4. Examinarea colposcopică	82
7.3.5. Testarea HPV	87
7.3.5.1. Testele de hibridizare (HC2)	88
7.3.5.2. Testele HPV bazate pe PCR	88
7.3.5.3. Testele HPV bazate pe detectarea mARN sau a oncoproteinelor virale E6/E7.....	89
7.3.6. Examenul histopatologic	90
7.3.7. Imunohistochimia	94
7.3.8. Examinarea pacienților de sex masculin	99

7.3.8.1. Examinarea clinică	99
7.3.8.2. Testarea HPV	100
7.3.8.3. Examenarea histopatologică	101
7.4. Perioada de studiu	101
7.5. Colectarea datelor și validarea bazei de date	101
7.6. Variabile de studiu	102
7.7. Metode de analiză a datelor	103

8. REZULTATE 105

8.1. OBIECTIVUL 1. Evaluarea caracteristicilor personale, a prevalenței unor factori de risc și a istoricului histopatologic și virusologic precedent examinării, la înrolare 105

8.1.1. Evaluarea caracteristicilor personale	105
8.1.1.1. Distribuția lotului de studiu pe grupe de vârstă	105
8.1.1.2. Distribuția în funcție de mediul de rezidență și nivelul de educație.....	105
8.1.1.3. Alte caracteristici personale (greutate, înălțime, BMI)	107
8.1.1.4. Numărul de nașteri și de avorturi	109
8.1.2. Evaluarea prevalenței unor factori de risc pentru cancerul de col uterin	110
8.1.2.1. Fumatul	110
8.1.2.2. Contraceptivele orale	111
8.1.2.3. Vârsta de debut a vieții sexuale	112
8.1.2.4. Numărul de parteneri sexuali	113
8.1.3. Evaluarea istoricului virusologic și histopatologic precedent înrolării	115
8.1.3.1. Testarea HPV în antecedente	115
8.1.3.2. Istoricul de vaccinare anti HPV	117
8.1.3.3. Istoricul histopatologic	117

8.2. OBIECTIVUL 2. Evaluarea statusului clinic, citologic, histopatologic și virusologic la înrolare 118

8.2.1. Analiza cohortei în funcție de examenul citologic Babeș Papanicolaou	118
8.2.2. Analiza cohortei în funcție de rezultatul colposcopiei	120
8.2.3. Testarea HPV la înrolare	123
8.2.4. Examenul histopatologic după înrolare	129
8.2.5. Examinarea prin imunohistochimie	130
8.2.6. Analiza rezultatelor citologiei în relație cu examenul histopatologic.....	132
8.2.7. Analiza rezultatelor colposcopiei în relație cu examenul histopatologic.....	134
8.2.8. Patologia asociată și infecții	136

8.3. OBIECTIVUL 3. Analiza prezenței genotipurilor HR HPV în relație cu leziunile colului uterin, în funcție de metoda de

diagnostic utilizată pentru identificarea leziunii	137
8.3.1. Asocierea genotipurilor HPV cu rezultatele citologice	137
8.3.1.1. Analiza prezenței celor mai frecvente cinci tipuri de HR HPV	142
8.3.2. Asocierea tipurilor de HPV în funcție de leziunile evidențiate la colposcopie	147
8.3.2.1. Analiza prezenței celor mai frecvente cinci tipuri de HR HPV	153
8.3.3. Asocierea tipurilor de HPV în funcție de rezultatele histopatologice	155
8.3.3.1. Analiza prezenței celor mai frecvente cinci tipuri de HR HPV	163
8.4. OBIECTIVUL 4. Evaluarea prospectivă a evoluției clinico-histologice și a statusului virusologic la doi ani de la înrolare	165
8.4.1. Rezultatele citologice la sfârșitul perioadei de urmărire	166
8.4.2. Rezultatele examenului colposcopic la sfârșitul perioadei de urmărire	168
8.4.3. Rezultatele examenului histopatologic la sfârșitul perioadei de urmărire	170
8.4.4. Evoluția statusului de infectivitate HPV	172
8.4.5. Evaluarea cohorței la finalul studiului	176
8.5. OBIECTIVUL 5. Evaluarea caracteristicilor personale, a prevalenței unor factori de risc și a statusului clinic și virusologic al partenerilor pacientelor din studiu	180
8.5.1. Evaluarea caracteristicilor personale și a prevalenței unor factori de risc la partenerii pacientelor din studiu	180
8.5.1.1. Distribuția lotului de studiu pe grupe de vârstă	180
8.5.1.2. Distribuția în funcție de nivelul de educație	181
8.5.1.3. Structura lotului în funcție de fumat	181
8.5.2. Evaluarea statusului clinic și virusologic al partenerilor pacientelor din studiu	182
8.5.2.1. Testarea HPV	182
8.5.2.2. Examinarea clinică prin peniscope	187
8.5.2.3. Compararea prezenței infecției HPV și a leziunilor specifice cu prezența infecției HPV și a leziunilor cervicale la partenerii bărbaților analizați în studiu	189
8.5.2.4. Rezultatele histopatologice pentru leziunile cervicale ale partenerilor bărbaților HPV+/-, cu/fără leziuni specifice HPV	191

9. DISCUȚII

CONCLUZII

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

LUCRĂRI PREZENTATE

1. Studiu comparativ între biopsia dirijată colposcopic și ERAD în diagnosticul leziunilor cervicale induse de HPV. **Gabriela Adriana Dincă** Lucrare prezentată la Seminarul Academiei Române , Institutul de Virusologie „Ștefan Nicolau”. București, oct.2000.

2. Tratamentul cu Imiquimod al leziunilor HPV la nivelul tractului genital inferior. **Gabriela Adriana Dincă**, Alin Constantin, Livia Manta.

Lucrare prezentată la a VI-a Conferință anuală de patologie cervicală – Dileme de conduită și situații practice dificile în patologia colului uterin. București, 20-21 noiembrie 2015.

LUCRĂRI PUBLICATE

1. Cytologic, colposcopic and histopathologic correlates in HPV induced lesions related to cervical intraepithelial neoplasia. **Gabriela Adriana Dincă**, Virginia Țârlea Radu Mociulschi, Mioara Ionescu, Niculina Coman. 4 th International Multidisciplinary Congress EUROGIN 2000, Paris – France, aprilie 2000, published in „International Proceedings Division”, MONDUZZI EDITORE, pg. 377-80.

2. Colposcopy directed biopsy or LLETZ in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Gabriela Adriana Dincă, Virginia Țârlea, Mioara Ionescu, Radu Mociulschi, Niculina Coman, Liliana Badon.

Poster prezentat la: 18th International Papillomavirus Conference. Barcelona – Spain. Jul 2000. Abstract 202 in Abstracts book.

3. Detectarea HPV cu risc crescut în leziunile CIN3. Gabriela Adriana Dincă, Virginia Țârlea, Radu Mociulschi, Mioara Ionescu, Niculina Coman

Poster prezentat la: Conferința Națională a Societății Române de Colposcopie și Patologia Tractului Genital Inferior. Craiova, sept. 2003.

4. HPV-HSIL lesions, diagnosis, treatment and recurrence. **Gabriela Adriana Dincă**, Bănceanu G, Suci N, Ionescu M, Pop L, Oprescu DN, Șârlea V, Măgurean O, Robe F, Sîrbu G.

Poster prezentat la: 9th International Multidisciplinary Congress EUROGIN. Cervical Cancer Prevention 20 Years of Progress and a Path to the Future. Abstract DP-1. In Abstracts book .

5. Histological correlations in cases of ASCUS or ASC-H cytology and HPV cervical infections. G. Dincă, N. Suci, L. Manta. Poster prezentat la: International Multidisciplinary Conference EUROGIN. HPV Infection and Related Cancers. Sevilla-SpainFeb.2015. Abstract P11-4. In: Abstracts book.

ARTICOLE PUBLICATE

1. STATUS OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS IN A COHORT OF ROMANIAN WOMEN. **Gabriela Adriana Dincă**, Daniela Nuți Oprescu, Florentina Ligia Furtunescu, Matei Dumitru. Acta Medica Transilvanica. 2017 Mar;22(1):4-7.

2. A FOLLOW-UP STUDY IN A GROUP OF WOMEN WITH ASCUS/ASC-H CYTOLOGY:PREVALENCE OF CARCINOGENIC HPV AND CLINICAL EVOLUTION. **Gabriela Adriana Dincă**, Daniela Nuți Oprescu, Mioara Ionescu, Florentina Ligia Furtunescu, Matei Dumitru. Acta Medica Transilvanica. 2017 Jun; 22(2):41-45.

PROBLEMA FUNDAMENTALĂ

Tumorile maligne reprezintă una dintre cele mai importante, complexe și dificile probleme ale patologiei umane iar când vorbim de cancerul de col uterin, discutăm de o boală cronică gravă, cu puternic impact medico-social, având ca perspectivă o evoluție severă, cu preponderență în situațiile în care depistarea s-a produs în stadii avansate de evoluție. [2]

Cancerul colului uterin reprezintă 86,6% dintre cancerurile genitale feminine dar rata de mortalitate este substanțial mai scăzută decât incidența, în lume, rata de mortalitate raportată la incidență fiind de 53%. [2-3]

În ceea ce privește mortalitatea, cancerul de col uterin este responsabil de 44% din decesele produse de cancer în sfera genitală afectând mai ales femeile tinere (în Europa apare frecvent la segmentul de vârstă de 30-50 de ani) când acestea sunt active pe plan profesional și familial și reprezintă o importantă cauză de ani de viață pierduți la scară planetară. [6-7] S-a estimat că în anul 2000, cancerul de col uterin a fost responsabil de 2,7 milioane de ani de viață pierduți în toată lumea, fiind cea mai importantă cauză de ani de viață pierduți în țările în curs de dezvoltare. [7]

Rata de supraviețuire la 5 ani variază în funcție de zonele geografice și depinde de stadiul de evoluție în care a fost depistat, fiind mai mare în țările dezvoltate ale lumii (73% în USA și 63% în Europa), și mult mai scăzută în țările în curs de dezvoltare și subdezvoltate (30,5 % în Africa). [8]

Dintre toate tumorile maligne, cancerul de col uterin este cel care poate fi cel mai eficient controlat prin metode de screening. [4]

Complexitatea problemei provine din faptul că, această maladie poate fi prevenită, fiind precedată de leziuni precanceroase (leziuni cervicale intraepiteliale - CIN sau displazii) cu evoluție lentă de 10-20 de ani, manifestate prin anomalii citologice care se pot depista în aceste stadii premaligne, mult mai ușor de tratat, cu condiția ca fiecare femeie să efectueze un simplu control ginecologic și un test citologic Babeș-Papanicolaou. [4,12]

În ultimii 50 de ani, screening-ul prin examenul citologic Babeș-Papanicolaou a redus în mod semnificativ mortalitatea prin cancer de col uterin, fără să reușească să înlăture în totalitate acest risc. [13,16]

În România se înregistrează anual, aproximativ 2.800 de cazuri noi de cancer de col uterin, cu 1.500-1.600 de decese și în fiecare an, sunt peste 15.000 de paciente înregistrate cu această patologie. [9]

România se situează pe primul loc în rândul țărilor din Uniunea Europeană în privința incidenței ($28,65/10^5$ femei) și a ratei standardizate de mortalitate, fiind de peste 3 ori mai mare decât media țărilor din Uniunea Europeană ($11,9 /10^5$ comparativ cu $3,1 /10^5$) cu o prevalență de $17,5/10^5$ anual. [2,25]

În România, cancerul de col uterin reprezintă 15% din totalul tumorilor maligne și este pe primul loc între cancerurile genitale feminine (67%) și a doua cauză de deces prin cancer la femei, vârsta medie de apariție este de 46,3 ani iar incidența maximă a bolii este la grupa de vârstă 50-55 de ani.[46]

În 2000, rata de incidență standardizată pe grupe de vârstă a fost de $24,6/10^5$ iar în 2014 s-au înregistrat 4.343 cazuri noi de cancer cervical, cu o rată de $28,6/10^5$ iar în prezent, România are cea mai ridicată rată de incidență și mortalitate prin cancer de col uterin din statele membre UE, de 31,51 cazuri, respectiv 11,94 decese la 100.000 locuitori (2014, European Health for All Database). [48,52]

În România se înregistrează o tendință de scădere a mortalității prin cancer de col uterin, începând cu anul 2006 dar evoluția acesteia contrastează puternic cu tendințele mortalității din UE și Europa, pentru care, scăderea este vizibilă ca tendință constantă în ultimele 5 decenii.

În ultimele decade, mortalitatea prin cancer de col uterin a înregistrat valori mari, de 6,3 ori mai mari decât media europeană, dar cu o evoluție în ușoară scădere, de la cea mai mare, de $11,5/10^5$ în 2002, la $10,8 /10^5$ în 2014, când s-au înregistrat 1.909 decese prin această formă de malignitate. [48, 51]

Această situație alarmantă din România se datorează faptului că nu a existat un Program național de screening pentru depistarea cancerului de col uterin.

În 2002, cu sprijinul Ministerului Sănătății din România, s-a demarat un Program de screening pilot pentru cancerul cervical în județul Cluj, coordonat de Institutul Oncologic Cluj ce a inclus femei cu vârste între 25-65 de ani, care a fost extins în opt regiuni ale României și până în 2006 a fost cuprinsă doar 18,4% din populația feminină eligibilă, de 200.000 de femei, datorită implementării greoaie și a lipsei infrastructurii logistice (personal calificat, laboratoare, controlul calității) și a fondurilor insuficiente alocate de Ministerul Sănătății. [48]

În perioada 2002 - 2008, când acest Program pilot a funcționat, s-au prelevat 75.568 frotiuri citologice și s-a constatat o rată a incidenței cancerului de col uterin de 30,39 /10⁵ în 2002, de 31,68 /10⁵ în 2006 și de 28,18 /10⁵ în 2013 iar rata de mortalitate a scăzut de la 30,39 /10⁵ în 2002 la 14,3 /10⁵ în 2006 și la 11,16 /10⁵ în 2008. [48]

Din 01.09.2012 a început să funcționeze primul Program Național de screening pentru cancerul de col uterin, pe baza Ordinului Ministrului Sănătății nr.569/26.06.2012, organizat pentru început în zece județe ale țării, urmând să fie extins în toată țara. [57] Acest Program și-a propus testarea prin metoda frotiului citologic convențional a 6 milioane de femei, cu vârste cuprinse între 25 – 64 de ani, pe o perioadă de 5 ani, având ca obiectiv reducerea incidenței formelor invazive de cancer de col uterin și reducerea mortalității specifice prin această formă de boală. În perioada 2012 - 2015 a fost testată doar 14,5% (630.000) din populația feminină eligibilă, cu o acoperire între 7,4 și 22,6 %, în funcție de regiune. Pentru această perioadă, în regiunea de Sud-Est a României au accesat programul 52.055 femei cărora li s-a efectuat testarea citologică și 10,7% dintre acestea au avut rezultate citologice anormale. [57] Nu există informații privind investigațiile ulterioare pe care le-au făcut aceste femei, câte dintre acestea au leziuni la nivelul colului uterin și dacă au fost tratate și nici câte cazuri de cancer de col uterin au fost depistate. [56]

Organizația Mondială a Sănătății consideră decesul prin cancer de col uterin ca deces evitabil, luând în considerare intervalul lung de evoluție al acestei boli și posibilitățile de diagnostic precoce și terapeutice actuale, care, aplicate în stadii precoce de boală, conduc la vindecare completă.

Astăzi este unanim acceptat faptul că HPV este principalul factor implicat în etiologia cancerului de col uterin și reprezintă cauza necesară pentru apariția acestuia. Infecția cu HPV este considerată infecție cu transmitere sexuală deoarece achiziția ei se face preponderent pe cale sexuală și precede cu câțiva ani dezvoltarea leziunilor intraepiteliale care pot evolua către cancer de col uterin.[19,109]

Teza este structurată în două părți: I. Partea teoretică și II. Partea specială.

I. Partea teoretică cuprinde 5 capitole. *Capitolul 1.* Cuprinde date epidemiologice și subliniază importanța și impactul epidemiologic al acestei maladii în întreaga lume cu accent asupra incidenței, prevalenței și mortalității în România, cunoscut fiind faptul că în țara noastră, ratele de incidență și mortalitate prin cancer de col uterin sunt cele mai ridicate dintre statele membre UE.

Capitolul 2. Descrie istoria naturală a cancerului de col uterin, accentuând asupra evoluției leziunilor intraepiteliale cervicale și a mecanismelor de intervenție a genotipurilor de HPV cu risc oncogen înalt, de la infecție până la transformarea malignă a epitelii cervicale infectate. Genotipurile de HPV sunt clasificate din punct de vedere filogenetic (genul alpha fiind cel mai important din punct de vedere al potențialului oncogen) și din punct de vedere al severității leziunilor pe care le produc (genotipuri HR – high risk, genotipuri LR – low risk și genotipuri cu risc intermediar). *Capitolul 3.* Descrie factorii de risc pentru cancerul colului uterin și se insistă asupra rolului infecției HPV, a prevalenței acesteia în lume și mai ales în România cât și a rolului partenerului masculin, a fumatului, consumului prelungit de contraceptive orale, a parității și a nivelului socio-economic în favorizarea dezvoltării leziunilor precanceroase cervicale și a cancerului de col uterin. *Capitolul 4.* Descrie metodele de diagnostic și se insistă asupra celor pentru depistarea precoce a leziunilor precanceroase în vederea stabilirii posibilităților terapeutice care pot determina întreruperea evoluției acestora către cancerul cervical cât și a metodelor pentru diagnosticul și stadializarea cancerului de col uterin. *Capitolul 5.* Face o expunere detaliată a metodelor de **prevenție primară**, insistându-se asupra vaccinării anti HPV și a celor trei tipuri de vaccin existente la ora actuală în lume și este evidențiată situația vaccinării anti HPV în România. Sunt subliniate metodele prevenției secundare (screening-ul prin frotiurile citologice Babeș-Papnicolaou și screening-ul prin testarea HPV) care au scopul de a depista și trata populația feminină la risc să dezvolte leziuni intraepiteliale cervicale și/sau cancer de col uterin și sunt amintite posibilitățile de prevenție terțiară care presupun tratamentul leziunilor cervicale intraepiteliale și a cazurilor de cancer de col uterin astfel încât să se reducă numărul deceselor prin această maladie.

II. Partea specială – am realizat un studiu prospectiv non-intervențional pe un lot de 732 de femei cu patologie de col uterin pe care le-am urmărit pe o perioadă de 2 ani.

Această parte a tezei am sistematizat-o în 5 capitole. În *Capitolul 6.* - am inclus ipotezele de lucru și obiectivele generale ale cercetării. În *Capitolul 7.* – am descris metodologia cercetării, materialul și metodele de cercetare (loturile de studiu, criteriile de includere și criteriile de excludere, factorii epidemiologici studiați pe care i-am preluat din chestionarul de studiu și fișele pacienților, rezultatele examenului citologic Babeș-Papanicolaou, rezultatele examenului colposcopic, rezultatele testării HPV, rezultatele histopatologice, rezultatele examenului imunohistochimic și metodele de analiza statistică). În *Capitolul 8.* – am prezentat rezultatele cercetării pe subcapitole. Am analizat cohorta de femei din punct de vedere al factorilor de risc, al statusului infecției HPV înainte de

înrolarea în studiu. Am analizat cohorta de femei la înrolare, din punct de vedere al examenului citologic Babeş-Papanicolaou, al examenului colposcopic și al testului HPV, în funcție de care s-au efectuat examinările histopatologice și imunohistochimice ulterioare. Am analizat statusul infecției HPV și implicarea acesteia în rezultatele citologice, în leziunile colposcopice și leziunile histopatologice. Am analizat statusul citologic, colposcopic, virusologic și histopatologic al pacientelor studiate după perioada de urmărire de 2 ani. Am analizat un lot de 164 de bărbați, parteneri ai pacientelor din lotul studiat, din punct de vedere clinic și virusologic, în scopul de a demonstra că infecția HPV la bărbați constituie un factor de risc pentru persistența infecției HPV și apariția mai frecventă a leziunilor intraepiteliale cervicale la femei. În *Capitolul 9.* – am discutat rezultatele obținute raportându-le și comparându-le cu datele din literatura de specialitate.

Capitolul 10. – a fost dedicat concluziilor, contribuției personale și direcțiilor de dezvoltare în urma cercetării realizate.

Obiective

Lucrarea de față s-a centrat pe abordarea cancerului de col uterin ca maladie potențial curabilă și cu mortalitate evitabilă, prin depistarea precoce a infecției HPV. Având în vedere faptul că infecția cu HPV este condiția necesară pentru apariția modificărilor citologice ce induc evoluția către cancerul de col uterin, putem încadra programele de depistare precoce a infecției HPV în categoria intervențiilor de modificare a distribuției factorului de risc, aparținând, deci, domeniului prevenției primare.

Obiectivele generale ale tezei de doctorat au fost următoarele:

- a. Evaluarea caracteristicilor personale, a prevalenței unor factori de risc și a statusului clinic, citologic și histopatologic precedent examinării, pentru o cohortă de femei cu patologie de col uterin care s-au prezentat pentru examinare la un cabinet de specialitate.
- b. Evaluarea statusului clinic, citologic, histopatologic și virusologic la înrolare și a concordanței între diferitele examinări.**
- c. Analiza prezenței genotipurilor HR HPV la înrolare, în relație cu leziunile colului uterin, în funcție de metoda de diagnostic utilizată pentru identificarea leziunii.**
- d. Evaluarea gradului de cunoaștere a statusului virusologic în funcție de severitatea afectării citologice și histologice la înrolare.

- e. Evaluarea prospectivă a evoluției clinico-histologice și a statusului virusologic la doi ani de la înrolare.
- f. Evaluarea caracteristicilor clinice și virusologice ale unui lot reprezentat de parteneri ai femeilor aflate în studiu.

Cercetarea de față a pornit de la următoarele ipoteze:

- a) În România factorii de risc comportamentali pentru cancerul de col uterin au o răspândire largă în populație, fiind prezenți în proporție mai mare la femeile mai tinere.
- b) Populația eligibilă pentru vaccinarea HPV nu aderă în totalitate la recomandarea medicală de vaccinare anti HPV, chiar în condițiile unei afectări clinice și histologice; (chiar în condițiile în care infecția cu HPV este cauza necesară pentru dezvoltarea cancerului de col uterin)
- c) Antecedentele personale privind fumatul, utilizarea de contraceptive orale, numărul partenerilor sexuali, vârsta de debut a vieții sexuale reprezintă factori favorizanți pentru persistența/agravarea leziunilor colului uterin
- d) Citologia are o sensibilitate convenabilă în a identifica o leziune de col uterin evidențiată prin colposcopie.
- e) Cele mai frecvente antigene de HPV cu risc înalt sunt 16, 18 și 31 (conform datelor din literatură)
- f) Tulpinile HPV cu risc oncogen înalt sunt prezente într-o proporție mai mare la persoanele cu anomalii citologice / colposcopice / histologice mai severe
- g) Evoluția leziunilor histologice induse de infecția persistentă cu tipuri de HPV cu risc oncogen înalt este mai favorabilă în condițiile tratamentului excizional al leziunilor și negativarea infecției HPV
- h) Urmărirea clinico-histologică a femeilor cu patologie de col uterin în conformitate cu ghidurile de practică conduce la îmbunătățirea stării de sănătate, prin ameliorarea leziunilor histologice și scăderea prevalenței HR HPV.
- i) Infecția HPV persistentă la partenerii sexuali favorizează achiziția și persistența infecției HPV la femei

METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII

Astăzi este unanim acceptat faptul că HPV este principalul factor implicat în etiologia cancerului de col uterin și reprezintă cauza necesară pentru apariția acestuia.

Infecția cu HPV este considerată infecție cu transmitere sexuală deoarece achiziția ei se face preponderent pe cale sexuală. Infecția persistentă cu genotipuri HR HPV produce modificări specifice la nivelul celulelor epitelului scuamos cervical care preced cu câțiva ani apariția leziunilor intraepiteliale cervicale de grad scăzut sau grad înalt, în funcție de genotipurile de HPV implicate și de factorii de risc care pot favoriza sau potența acțiunea acestora. [19,109]

Depistarea precoce a infecției HPV, mai ales cu genotipuri cu risc oncogen înalt, selectează populația feminină la risc, susceptibilă de a dezvolta leziuni intraepiteliale cervicale, care nedepistate în timp util, pot evolua către cancer de col uterin.

Lucrarea de față și-a propus să releve importanța depistării precoce și a urmării corecte a infecției HPV, prin analiza statusului clinic, citologic, virusologic și /sau histopatologic la un grup de paciente cu leziuni de col uterin, pentru un interval de 2 ani.

Tipul studiului

Am realizat un studiu prospectiv non-intervențional, argumentul pentru caracterul prospectiv fiind reprezentat de faptul că subiecții incluși în studiu au fost urmăriți la interval de 6 – 12 luni sau ori de câte ori a fost necesar, pentru o perioadă de 2 ani.

Caracterul non-intervențional este susținut de faptul că subiecților incluși în studiu li s-au aplicat măsurile terapeutice considerate necesare în funcție de statusul clinic, histopatologic și virusologic, în conformitate cu protocoalele de practică actuale și cu experiența clinică a cercetătorului. Nu au fost testate medicamente/intervenții noi pe grup de tratament și grup de control.

Populația de studiu

Populația de studiu a fost reprezentată de un lot de 732 de femei cu patologie de col uterin, care s-au adresat unui cabinet de specialitate din București, cu trimitere de la medicul de familie sau de la alți specialiști ori din proprie inițiativă (în mod pasiv), pentru consultație ginecologică, centrată pe examinarea colului uterin și a tractului genital inferior.

Toate pacientele au fost examinate ginecologic și pentru toate s-a efectuat colposcopia și s-au făcut prelevări pentru examen citologic și bacteriologic din secreția vaginală, iar pentru marea majoritate (590), deși s-a recomandat tuturor, s-a efectuat prelevarea pentru testarea HPV, respectându-se protocolul de studiu. Costul testării HPV a fost achitat de fiecare pacientă în parte dar acesta fiind ridicat, nu toate pacientele și-au putut permite acest lucru.

Rezultatele obținute au fost introduse și centralizate într-un tabel Microsoft Excel care a constituit baza de studiu.

Datele au fost culese din fișele personale ale femeilor (Anexa nr.1) și chestionarul de studiu (Anexa nr. 2) unde au fost consemnați factorii epidemiologici, clinici, paraclinici și de diagnostic.

A mai fost inclus un lot de 164 de bărbați, reprezentat de o parte a partenerilor pacientelor investigate în studiu, care au fost examinați clinic și virusologic.

Criteriile de includere au fost:

- femei cu vârsta ≥ 18 ani
- femei negravidă la momentul includerii în studiu
- paciente care au avut în antecedente patologie de col uterin și / sau infecție HPV
- paciente cu citologie normală cu / fără leziune identificată prin colposcopie
- paciente cu anomalii citologice clasificate conform sistemului Bethesda
- paciente cu infecție HPV, indiferent de citologie și colposcopie
- acceptul pacientei și semnarea consimțământului informat.

Criteriile de includere pentru cei 164 de bărbați incluși în studiu au fost: Bărbați cu vârsta ≥ 18 ani,

- Bărbați cu testare pozitivă pentru HPV
- Bărbați cu patologie genitală determinată de infecția HPV
- Bărbați care au venit pentru investigații deoarece partenerii lor aveau testare pozitivă pentru HPV și /sau, leziuni cunoscute determinate de infecția HPV.

Criteriile de excludere au fost:

- femei cu vârsta ≤ 18 ani
- femei însărcinate la momentul prezentării

Protocolul de examinare s-a bazat pe următoarele investigații:

- Examinarea clinică
- Examenul bacteriologic al secreției cervico-vaginale
- Examenul citologic
- Examinarea colposcopică
- Testarea HPV
- Examenul histopatologic
- Imunohistochimie

- Examinarea pacienților de sex masculin
 - Examinarea clinică
 - Testarea HPV
 - Examinarea histopatologică

Perioada de studiu

Studiul s-a realizat în perioada 2010 – 2016, vizând pentru fiecare subiect o perioadă de urmărire de doi ani.

Etapa de înrolare s-a realizat în 2010 – 2014.

Colectarea datelor și validarea bazei de date

Rezultatele obținute au fost introduse și centralizate într-un tabel Excel care a constituit baza de studiu.

Datele au fost colectate din fișa pacientului și chestionarul de studiu unde au fost consemnați factorii epidemiologici, clinici, paraclinici și de diagnostic și din chestionarul de studiu. (Anexa nr.1, Anexa nr.2)

Asigurarea calității datelor s-a realizat prin selectarea a 5% dintre fișele vizate, cu pas mecanic și verificu s-au constata eror.

Validarea datelor s-a realizat cu ajutorul programului SPSS v23.0, prin funcția ”Analyse” – frequencies. S-au analizat frecvențe pentru toate variabilele de tip calitativ. Toate variantele neconforme au fost corectate.

Variabile de studiu

S-au utilizat următoarele categorii de variabile:

- a) variabile actuariale: vârsta, mediul de rezidență, nivelul studiilor
- b) variabile personale: greutate, înălțime, indice de masă corporală
- c) antecedente personale: nașteri, avorturi, vârsta de debut al vieții sexuale, număr parteneri, fumat, administrare contraceptive
- d) variabile de tip clinic: citologie, colposcopie, leziuni asociate, tipaj HPV, examinare histopatologică, imunohistochimie.

Variabilele incluse în studiu au fost de tip cantitativ continuu (vârsta, vârsta de debut al vieții sexuale, greutatea, înălțimea) sau discrete (nr nașteri, nr avorturi) sau au fost variabile de tip calitativ, în general nominale (ex. citologia, colposcopia, histopatologia, imunohistochimia).

Protocolul de cercetare a avut următoarele etape:

- a. Vizita de înrolare: 1. notarea caracteristicilor actuale și a antecedentelor personale și medicale ale pacientei; 2. practicarea citologiei; 3. practicarea colposcopiei;
4. recomandarea de testare HPV; 5. practicarea examenului histopatologic, în circumstanțele recomandate de ghidurile de practică, urmat sau nu de imunohistochimie și reexaminare histopatologică.
- b. Vizitele de follow-up: 1. practicarea citologiei; 2. practicarea colposcopiei; 3. recomandarea de testare HPV; 4. practicarea examenului histopatologic, în circumstanțele recomandate de ghidurile de practică, urmat sau nu de imunohistochimie și reexaminare histopatologică.

Metode de analiză a datelor

Toate variabilele au fost verificate din punct de vedere al variantelor posibile, folosind funcția frequency din SPSS v.23.0.

Variabilele de tip cantitativ au fost analizate din punct de vedere al tipului de distribuție utilizând testul Kolmogorov Smirnov (pentru $p < 0.05$). S-au analizat parametri de tendință centrală (media, mediana) și de dispersie (deviația standard, min, max).

Variabilele calitative au fost analizate ca proporții.

Comparațiile statistice s-au realizat utilizând testul T student și respectiv Testul medianei pentru variabilele cantitative gaussiene, respectiv negaussiene.

Pentru variabilele calitative s-a utilizat testul χ^2 sau testul Fisher, după caz.

S-a optat pentru un prag de semnificație de 0,05, caracteristic științelor biomedicale.

S-au realizat corelații Spearman.

S-au calculat validitatea și concordanța citologiei în relație cu colposcopia, respectiv a citologiei și colposcopiei în relație cu examenul histopatologic. De asemenea, s-a calculat concordanța între examinarea histopatologică inițială și cea realizată după imunohistochimie.

În ceea ce privește validitatea, s-a calculat sensibilitatea, ca proporția rezultatelor pozitive în masa bolnavilor și respectiv specificitatea, ca proporția rezultatelor negative în masa non-bolnavilor. Acolo unde s-a considerat de interes, s-a calculat proporția fals-pozitivilor, respectiv a fals-negativilor.

În ceea ce privește concordanța, s-a analizat procentul simplu de concordanță (proporția rezultatelor concordante din totalul determinărilor).

S-a analizat evoluția cazurilor înrolate atât global, prin compararea proporțiilor diferitelor variante ale citologiilor, colposcopiilor și a statusului HPV la înrolare și la finalul studiului, cât și la nivel individual, prin analiza evoluției leziunilor citologice, colposcopice, histopatologice.

S-au calculat riscuri relative de persistență/agravare a bolii pentru diferite expuneri, cu intervalele de încredere.

Analiza datelor s-a realizat cu programele SPSS v. 23.0 și Open Epi, iar reprezentările grafice s-au realizat cu programele SPSS v 23.0 și Microsoft Excel.

Rezultatele au fost sintetizate sub formă de tabele și grafice incluse în text. Prezentarea rezultatelor s-a realizat urmând obiectivele definite.

REZULTATE ȘI CONCLUZII

După cum am arătat în partea generală, infecția HPV, considerată infecție cu transmitere sexuală, este unanim acceptată drept factorul etiologic al cancerului de col uterin și reprezintă cauza necesară pentru apariția acesteia. Modificările citologice pe care le produce infecția persistentă cu genotipuri de HPV cu risc oncogen înalt pot fi depistate cu mult timp înaintea apariției leziunilor de col uterin cu potențial de evoluție spre cancer. Pornind de la acest aspect consider că identificarea femeilor infectate cu HPV selectează populația feminină la risc pentru dezvoltarea acestei maladii.

Scopul acestei lucrări a fost să evidențieze importanța depistării precoce și a urmării corecte a infecției HPV, prin analiza statusului clinic, citologic și virusologic la un lot de paciente cu leziuni de col uterin, pentru un interval de doi ani.

În cadrul acestui demers s-au desprins următoarele concluzii:

1. Am efectuat un **studiu prospectiv**, în care am analizat și am urmărit un lot de 732 de femei din punct de vedere al prezenței infecției HPV și al efectelor acesteia la nivelul colului uterin.
2. În urma analizei aspectelor epidemiologice și a factorilor de risc am constatat că **lotul populațional pe care l-am investigat este diferit de populația generală** și are următoarele caracteristici particulare: este format din femei tinere, cu vârstă medie de $33,73 \pm 8,216$ ani și o vârstă mediană de 33 ani, ponderea cea mai mare fiind reprezentată de

grupa de vârstă 25-30 de ani; peste 70% dintre femeile investigate au pregătire superioară; 90% dintre femei provin din mediul urban; majoritatea au un nivel socio-economic ridicat care le permite accesul la serviciile medicale; sunt preocupate de propria sănătate, aspect ilustrat de faptul că majoritatea sunt normoponderale și fumează mai puțin de o treime, 28,2% (n=206); doar 16,6% utilizează contraceptive orale; au puține nașteri și majoritatea sunt nulipare; au un număr mare de avorturi; majoritatea și-au început viața sexuală la o vârstă tânără (≥ 18 ani); au avut un număr mediu de 3 parteneri sexuali.

3. Am efectuat analiza comparativă a factorilor de risc care au influențat evoluția leziunilor cervicale pentru pacientele din studiu și am obținut riscuri relative peste valoarea 1 și semnificative statistic pentru: vârsta sub 25 ani, fumatul, utilizarea contraceptivelor orale, prezența HPV HR la sfârșitul studiului și prezența HPV 16.

Pacientele agravate au fost influențate semnificativ statistic de consumul de contraceptive orale, comparativ cu pacientele care s-au vindecat.

Am constatat o corelație inversă slabă, dar semnificativă între vârsta de debut a vieții sexuale (≥ 18 ani) și numărul partenerilor sexuali (≤ 3) în ceea ce privește evoluția pacientelor care s-au vindecat comparativ cu cele care s-au agravat.

O corelație directă slabă și semnificativă am arătat între vârsta femeilor (sub / peste 25 ani) și vârsta de debut a vieții sexuale (≥ 18 ani) și o corelație inversă foarte slabă, dar semnificativă, între vârsta femeilor (sub / peste 25 ani) și numărul de parteneri sexuali (≤ 3).

4. Din antecedentele femeilor incluse în studiu am reținut următoarele: 12,5% (n=91) aveau o testare HPV documentată anterior, genotipul **HR HPV 16** a avut prevalența cea mai ridicată, fiind prezent în peste o treime din cazuri (la 35,2% dintre femeile testate) și doar 6,0% fuseseră vaccinate anti HPV. Din lotul studiat, 91 de femei au avut leziuni la nivelul colului uterin, confirmate histopatologic și aproape trei sferturi dintre acestea au fost leziuni intraepiteliale de grad înalt și un caz de carcinom invaziv.

5. Evaluarea femeilor la controlul de la înrolare, am efectuat-o prin **examenul citologic Babeș – Papanicolaou** care a evidențiat rezultate citologice anormale la 80%, dintre femeile analizate, prin **colposcopie** prin care am vizualizat leziuni cervicale la 85,9% dintre femei, între cele două metode utilizate existând o concordanță generală de 67,8% și prin **testarea HPV**. Sensibilitatea citologiei în raport cu colposcopia a fost de 87,9%, pentru evidențierea leziunilor cervicale dar a fost o sensibilitate destul de scăzută (59,5%) a citologiei pentru identificarea leziunilor de grad major, TAG2. Am observat o sensibilitate

mai mare a citologiei, de 71,9% , în identificarea leziunilor de grad scăzut, TAG1 și am arătat o specificitate de 64,7% în privința rezultatelor citologice normale, raportate pacientelor fără leziuni detectabile la colposcopie.

6. Am arătat că **prevalență generală a infecției HPV** la femeile testate la înrolare a fost de **84,2%** iar 80,8% dintre femeile din studiu au fost infectate cu genotipuri de HPV cu risc oncogen înalt și 2,7% cu genotipuri HPV cu risc oncogen scăzut.

Infecțiile cu genotipuri HR HPV au fost în proporția cea mai mare, în 47,8% din cazuri au fost infecții cu un singur genotip, în 18,0% au fost infecții cu genotipuri HR HPV asociate și în 15,1% au fost infecții cu genotipuri HR +LR HPV.

Cele mai frecvente genotipuri de HR HPV au fost din **genul alfa, specia 9** (genotipurile 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67) la 50% dintre paciente, urmate de cele din **specia 7** (genotipurile 18, 39, 45, 59, 68, 70), la 20,2% dintre pacientele analizate în studiul de față.

Pe primele cinci locuri, în ordinea frecvenței, am evidențiat că s-au situat genotipurile: **HPV16, HPV31, HPV51, HPV18 și HPV52.**

Prevalența cea mai mare a avut-o **HR HPV 16** (31%) atât în infecțiile unice (18,3%) cât și în infecțiile asociate (10,7%) iar celelalte genotipuri mai frecvent întâlnite în analiza noastră au avut prevalențe mult mai mici. HR HPV18 s-a situat pe locul al patrulea, cu o prevalența de 9,7% și o pondere în jur de 3%, atât în infecțiile unice cât și în infecțiile asociate.

7. Am subliniat că prin examenul histopatologic s-au diagnosticat 48 (14,4%) de leziuni de grad scăzut (CIN1), 280 (83,8%) de leziuni de grad înalt, dintre care leziunile CIN2 au fost 196 (58,7%) iar leziunile **CIN3 și CIS** au avut o pondere de **23,1% (n=77)**. Am mai diagnosticat 5 cazuri de carcinom microinvaziv, două cazuri de adenocarcinom in situ, un caz de adenocarcinom invaziv și 5 cazuri de carcinom scuamos.

8. Am arătat că între diagnosticul histopatologic inițial și cel stabilit prin imunohistochimie, concordanța a fost de 64,4 % iar supraevaluarea examenului histopatologic a fost pentru 30,5% dintre cazurile analizate.

9. În lotul de femei pe care l-am studiat, testarea HPV au efectuat-o 590 dintre ele și am demonstrat că în sublotul testat HPV, rezultatele citologiei nu au fost diferite statistic față de cohorta de studiu, distribuția anomaliilor citologice și a patologiei au fost similare, femeile care nu au făcut testul fiind comparabile cu cele care l-au făcut.

10. Am arătat că **prevalența HR HPV în citologiile normale a fost de 14,2%** iar distribuția descrescătoare pe primele cinci locuri a tipurilor de HR HPV a fost următoarea:

HPV16, HPV51, HPV31, HPV18 și 52. **Ponderea cea mai mare, de 49,9%, au avut-o genotipurile speciei alpha 9** iar ponderea genotipurile speciei alpha 7 a fost de 17,7%.

Infecțiile unice cu tipuri de HR HPV au avut ponderea de 36,5% iar cele cu tipuri HR asociate, de 30,7%.

11. În studiul pe care l-am făcut am arătat că **în clasele citologice cu anomalii**, ponderea infecțiilor HR HPV a fost 82,3% pentru ASCUS, 75,9% pentru ASC H și 71,7% pentru HSIL iar infecțiile cu tipuri unice HR HPV în proporțiile cele mai mari au fost pentru ASC H, 56,9% și HSIL 50%.

În toate clasele citologice cu anomalii, ponderea cea mai mare a avut-o **HPV 16**, proporția sa crescând de la 27,6% și 28,9% în citologiile ASCUS și LSIL, la 35,8% și 50,7% în citologiile ASC H și HSIL.

Ponderea cea mai importantă în toate clasele citologice cu anomalii au avut-o genotipurile de HR HPV din genul alpha 9, care au avut proporții asemănătoare în citologiile ASCUS, LSIL și ASC H (63,8%, 61,4% și respectiv 66%) dar în citologiile HSIL ponderea lor a fost de 89,3%.

HR HPV18 a avut o pondere aproximativ egală în clasele citologice ASCUS (10,3%) și LSIL (10,5%), dar a fost prezent în 9,3% dintre citologiile HSIL și cea mai mare reprezentare a fost în cadrul citologiilor ASC H (11,3%).

12. Am arătat că la **colposcopie** am vizualizat leziuni reprezentate de modificări minore sau transformări atipice de grad 1 (TAG1) în proporție de 60,9% și 27,0% leziuni de grad major sau transformări atipice de grad 2 (TAG2) și nu am vizualizat leziuni cervicale la 12,1% dintre paciente.

13. În studiul de față, **testarea diferențelor între numărul de cazuri HPV +/- HPV- pe tipuri de leziuni colposcopice**, între cele fără leziuni identificate prin colposcopie (CN) și cele cu leziuni de grad minor (TAG1) cât și între leziunile de grad minor (TAG1) și leziunile de grad major (TAG2), nu a atins semnificația statistică (CN/TAG1 0.062; TAG1/TAG2 0.169), dar proporția tipurilor HR HPV a fost semnificativ mai crescută în grupul TAG1 față de CN.

De asemenea, aceasta proporție a fost mai ridicată în grupul TAG2 față de TAG1 (88,1% față de 80,1%), dar diferența nu a atins semnificația statistică.

În leziunile de grad major, am arătat că **infecțiile cu tipurile de HR HPV unice sau asociate au fost într-un procent foarte mare, de 88,1%**, iar monoinfecțiile au

reprezentat 61,6% iar în leziunile de grad minor, infecțiile HR HPV, au avut o proporție însemnată, de 80,8%, din care 43,8% au fost monoinfecții.

Am evidențiat că în toate tipurile de leziuni și chiar la pacientele cu col normal, **genotipurile alpha 9 au avut prevalența cea mai mare** iar dintre toate genotipurile de HR HPV analizate doar pentru **HPV16 s-a observat o tendință clară de creștere în funcție de gravitatea leziunilor vizualizate colposcopic**, de la 19,7% la pacientele cu col normal, la 27,4% la cele cu leziuni de tip TAG1, până la 45,3% la cele cu leziuni de tip TAG2.

Am arătat că **în leziunilor de grad major (TAG2)**, pe primele locuri s-au distribuit genotipurile de HPV recunoscute ca având potențialul oncogen cel mai mare, din specia alpha 9, (HPV16, 31 și 33) și HPV18 din specia alpha.7, care s-a poziționat înaintea genotipului HPV33, această distribuție regăsindu-se corelată și cu citologiile HSIL.

14. Am demonstrat o concordanță așteptată între cele mai severe anomalii citologice cu cele mai grave leziuni colposcopice și cu genotipurile HPV cu riscul oncogen cel mai ridicat.

15. În urma analizei celor 274 de femei care au beneficiat de examen histopatologic, am demonstrat, în raport cu testarea HPV, că nu au fost diferențe semnificative statistic în ceea ce privește distribuția leziunilor histopatologice între femeile cu testare HPV și cele fără testare HPV și am tras concluzia că distribuția leziunilor cât și gravitatea lor, au fost asemănătoare la femeile testate și la cele netestate HPV.

Am arătat că **leziunile intraepiteliale de grad scăzut reprezentate de CIN1 au fost în proporție mică, de 14,6% iar 85,0% dintre tipurile de HPV implicate au fost din grupa HR**, majoritatea fiind monoinfecții (42,5%).

Am evidențiat o situație particulară în leziunile CIN2 care au fost HPV pozitive în proporție de 79,5% iar proporția rezultatelor negative a fost mai mare decât pentru leziunile CIN1 (20,5% față de 15%) iar ponderea infecțiilor cu tipuri unice de HPV nu a fost foarte diferită de CIN1 (49,4% și respectiv 42,5%).

Chiar dacă numărul leziunilor CIN2 a fost net superior față de numărul leziunilor CIN1, testarea diferențelor între numărul de cazuri HPV+/HPV- pe cele două tipuri de leziuni histologice, CIN1/CIN 2, nu a atins semnificația statistică.

16. Am evidențiat că **56,5% dintre leziunile CIN3 au fost pozitive pentru infecții cu genotipuri unice de HR HPV** și totodată că ponderea infecțiilor unice a crescut de la CIN1 (42,5%) la CIN2 (49,4%) și apoi la CIN3 (56,5%). O creștere asemănătoare am ilustrat și pentru ponderea asocierilor de tipuri HR HPV de la 12,5% în leziunile CIN1 la 16,0% în leziunile CIN2, până la 24,6% în leziunile CIN3.

17. În cursul studiului **am depistat 14 cazuri de cancer** din care doar 8 au avut testare HPV și toate au fost asociate cu tipuri unice de HPV.

18. Am analizat diferențele între numărul de cazuri HPV+/HPV- pe tipuri de leziuni histologice și am demonstrat că între CIN1/CIN2, prevalența tulpinilor HR HPV este comparabilă dar **între CIN2/CIN3 există diferență statistică în proporția rezultatelor HR HPV, femeile cu leziuni CIN3 având proporția rezultatelor HR HPV pozitive, semnificativ mai mare decât femeile cu leziuni CIN2. Între CIN3/cancere, nu am găsit diferență statistică între proporția rezultatelor pozitive pentru HR HPV.**

19. În leziunile din studiul nostru **au fost prezente aproape în totalitate, infecții HR HPV unice sau asociate** iar analiza categoriilor de HPV HR / LR a evidențiat că **proporția genotipurilor HR a crescut concomitent cu gravitatea leziunii** dar nu s-a putut evalua semnificația statistică deoarece tipurile LR au lipsit în trei din cele patru variante în care au fost grupate în funcție de risc, genotipurile HR HPV.

20. **Am confirmat că în toate leziunile histopatologice ponderea cea mai mare a fost pentru genotipurile grupului alpha 9 iar în leziunile CIN3 au fost implicate genotipurile HPV 16, 31 și 33, considerate genotipurile cu cel mai puternic potențial oncogen din genul alpha 9.**

Am evidențiat tendința clară de creștere a prevalenței HPV16 în funcție de gravitatea leziunii histopatologice, în CIN3 valoarea acesteia fiind aproape triplă față de leziunile CIN1-2. (20,0% în CIN1, 24,4% în CIN2, **58,8% în CIN3 și 77,8% în cancere**).

21. Pe cele 732 de femei înrolate la începutul studiului, le-am urmărit pentru o perioadă cu durata medie de 29±11 luni, iar durata mediană de 25 de luni, deoarece, s-a considerat ca reper pentru examinarea de supraveghere de doi ani, examinarea cea mai apropiată de data împlinirii a 24 de luni de la înrolare. Dintre acestea, 49 de femei au efectuat doar controlul de la înrolare și apoi au fost pierdute din urmărire iar la controlul final au ajuns 683 de femei.

22. Am evidențiat că **la sfârșitul perioadei de urmărire (T2), rezultatele citologice au avut o reprezentare diferită decât la controlul de la înrolare (T0): ponderea citologiilor fără anomalii a crescut de la 19,4% (n=142) la T0, la 56,4% (n=385) la T2, arătând evoluția favorabilă pentru 35,6% (n=298) dintre femeile rămase în atenția noastră până la sfârșitul studiului.**

23. Am arătat că 61 (8,3% dintre rezultatele citologice la T0) dintre pacientele cu citologie normală la intrarea în studiu, la T2, au avut citologii modificate, după cum urmează: 39 ASCUS, 12 LSIL, 7 ASC H, 2 HSIL și 1 AGC.

24. Am arătat că cele 266 citologii ASCUS la T0, la T2 s-au repartizat astfel: 142 (53,4% dintre rezultatele inițiale ASCUS care au reprezentat 20,8% din totalul rezultatelor citologice la T2) s-au normalizat, 76 (28,6%) au persistat, 26 (9,8%) au trecut în clasa LSIL, iar 22 (12 ASC H și 10 HSIL) s-au agravat, proporția ultimelor fiind de 4,5% și respectiv 3,7% iar dintre cele 127 de citologii LSIL la T0, 64 (50,4%) s-au normalizat, 35 au trecut în clasa ASCUS, 22 au persistat iar 5 s-au agravat, trecând în clasa ASC H și HSIL.

25. Am evidențiat că 65,4% dintre rezultatele ASC H s-au normalizat, 20% au trecut în clasa ASCUS, 7 cazuri au trecut în clasa LSIL și un singur caz a fost în aceeași clasă citologică.

Subliniez că rezultatele HSIL au avut cea mai bună evoluție, determinată de tratamentele aplicate la scurt timp după diagnosticul leziunilor, persistența lor fiind determinată de neprezentarea pacientelor la controalele ulterioare.

26. **Din punct de vedere al prevenirii cancerului de col uterin** mi s-a părut interesant să subliniez că cele mai severe grupe de anomalii citologice **ASC H și HSIL au scăzut de aproape trei ori ca pondere**, de la 20,2 % la T0, la 7.2% la T2, iar anomaliile glandulare prezente la T0 la 14 paciente s-au mai întâlnit doar la două dintre ele la T2. Rezultatele citologice HSIL prezente la 84 de paciente la T0, s-au corelat cu leziuni CIN3+ în proporție de 69% iar la controlul final mai erau prezente la 20 de paciente.

27. **La controlul final**, prin intermediul colposcopiei, **am arătat că ponderea femeilor cu col normal a fost de trei ori mai mare decât la controlul de la înrolare.**

Am arătat că leziunile de grad major TAG2, au scăzut de trei ori ca pondere până la controlul final iar ponderea leziunilor minore TAG1 a scăzut de la 60,4% la 42,7%.

Am demonstrat că 65% dintre leziunile TAG1 au evoluat nefavorabil și s-au agravat la T2, arătând că și atunci când sunt sub supraveghere, unele leziuni cervicale pot avea o evoluție rapidă și severă.

28. Am demonstrat că pentru femeile fără leziuni la nivelul colului sau vaginului (10 paciente au avut histerectomie totală în timpul desfășurării studiului) ponderea rezultatelor citologice normale (NILM) de 87,1%, a arătat o **specificitate** bună pentru pacientele cu evoluție favorabilă.

29. Nu am înregistrat rezultate citologice fals negative (NILM) la femeile cu leziuni de grad major, TAG2 și am confirmat o sensibilitate bună a citologiei în identificarea leziunilor cervicale.

La femeile fără leziuni cervicale/vaginale, ponderea rezultatelor citologice cu anomalii (toate categoriile) a fost de 6,4% (fals pozitive), confirmând **specificitatea bună a citologiei față de colposcopie în lotul analizat.**

30. Am demonstrat că pentru leziunile de grad major s-au distribuit doar rezultate citologice cu anomalii, ponderea cea mai mare fiind a rezultatelor ASC H și HSIL, acest aspect confirmând **sensibilitatea crescută a colposcopiei de a identifica leziunile de grad major.**

31. În cursul perioadei de urmărire, pentru 92 de paciente, evoluția leziunilor a impus examen histopatologic, dintre acestea 37 erau la a doua examinare, prima fiind efectuată imediat după înrolarea în studiu, pentru leziuni de grad înalt (CIN2+) la 89% dintre ele.

32. Am arătat că la cele 31 de leziuni CIN3 și CIS, depistate în timpul desfășurării studiului, al doilea examen histopatologic efectuat a confirmat aceeași leziune doar în trei cazuri, restul fiind leziuni CIN1-2. Pe toate le-am considerat **leziuni reziduale**, reexaminarea lor efectuându-se în general, la un interval de maxim 6 luni de la prima investigație, ponderea lor fiind de 11,1% dintre toate leziunile histopatologice diagnosticate.

33. Am scos în evidență că în perioada de desfășurare a studiului, au mai fost 53 de leziuni cu examinare histopatologică, pe care le-am considerat **leziuni incidente**, care s-au dezvoltat în acest interval iar distribuția lor a fost următoarea: 5 CIN1, 24 CIN2, 20 CIN3, 2 CIS, un AIS și un caz de carcinom invaziv, ponderea lor raportată la toată cohorta pe

care am avut-o în urmărire fiind de 7,5%. Imunohistochimia a confirmat gradul displaziei la 20 dintre cele 26 de cazuri CIN3 care au efectuat această investigație.

34. Am arătat că la finalul studiului, 436 (63,8%) dintre femeile cohorței inițiale au efectuat testarea HPV, **proporția celor HPV pozitive scăzând de la 84% la T0, la 65,4% la T2 și am constatat că proporția rezultatelor HPV negative la controlul final T2, a fost semnificativ mai mare, reprezentând peste o treime din cazurile testate.**

35. În funcție de clasificarea inițială a asocierilor dintre tipurile de HPV după gradul de risc al infecției (infecții unice sau asociate de HR HPV) am arătat că **la controlul final (T2), proporția rezultatelor pozitive a fost semnificativ statistic mai redusă decât la controlul inițial, înregistrându-se scăderea tuturor genotipurilor de HR HPV din infecții unice sau asociate.**

36. **Am analizat distribuția descrescătoare a frecvenței tipurilor de HR HPV la T2 și am arătat că pe primele cinci locuri s-au situat aceleași genotipuri ca și în cohorta inițială: HPV16, HPV31, HPV51, HPV18 și 52.**

37. **Am demonstrat că inclusiv pentru HPV16 s-a înregistrat o scădere semnificativă statistic, de la 31% la T0, la 20,2% la evaluarea de la T2, aspect important de subliniat pentru evoluția femeilor din cohortă.**

38. Am demonstrat scăderea semnificativă statistic a prevalenței HPV51, 18, 52, și 56, am arătat că scăderea prevalenței nu a fost semnificativă pentru HPV31 iar pentru HPV66 scăderea a fost aproape de atingerea semnificației statistice.

39. Am arătată că la sfârșitul studiului, **genotipurile alpha 9 au avut cea mai mare pondere, de 44,5%.**

40. **La finalul studiului, în funcție de criteriile alese, am arătat că ponderea femeilor vindecate a fost de 38,5%, a celor staționare de 40% iar a celor agravate de 14,8%, din totalul cohorței finale iar 6,7% dintre femei au fost pierdute din urmărire.**

41. Am evidențiat că dintre pacientele pe care le-am considerat **vindecate** la sfârșitul studiului, pe criteriul citologiei și colposcopiei, **41,6% au rămas HR HPV pozitive iar HPV16 a avut o pondere de 30,6%.**

42. Am considerat că femeile cu **evoluție staționară** au avut fie citologii cu anomalii minore din clasa ASCUS și LSIL ori leziuni de grad minor TAG1, evidențiate la colposcopie. Am constatat că **peste ¾ dintre ele au fost HPV pozitive** iar **HPV16** a avut o pondere de aproximativ **30%** față de celelalte genotipuri HR HPV 31, 51, 18 și 52.
43. Pacientele pe care le-am considerat **aggravate**, au reprezentat 20% din cele prezente la sfârșitul studiului, **au fost HR HPV pozitive în proporție de 94,8%** iar monoinfecțiile cu **HPV16** au avut cea mai mare pondere, de **41,9%**. În această categorie au fost incluse pacientele cu leziuni de grad major TAG2 și citologie ASC H / HSIL.
44. În studiul de față **am demonstrat o diferență semnificativă statistic în privința numărului de parteneri (≥ 3) la pacientele care s-au vindecat comparativ cu cele care s-au agravat.**
45. O corelație semnificativă statistic s-a demonstrat între prezența **HPV16** la T2 și **evoluția agravată** a pacientelor din studiul de față.
46. Am inclus în studiu și 164 de bărbații, parteneri ai unui sublot dintre pacientele urmărite și am arătat că la testarea HPV, efectuată la 146 dintre pacienți, s-au înregistrat **rezultate pozitive la 80% (n= 117)** dintre aceștia.
47. Am constatat că în **34%** dintre cazuri au fost **infecții cu asocieri de genotipuri HR și LR** iar **20% dintre infecții au fost cu tipuri unice de HR HPV.**
48. Am evidențiat 36 de genotipuri diferite de HPV iar pe **primele cinci locuri**, în ordinea frecvenței, s-au situat: **HR 16, HR 51, HR 31, HR 52, LR 6**. Pe primele locuri s-au identificat serotipuri de HPV cu risc oncogen crescut, tipul **HPV 16** având cea mai mare reprezentare, de **19,5%**, iar dintre genotipurile LR HPV, cel mai frecvent întâlnit a fost HPV 6.
49. Am arătat că infecția cu un singur tip de HR HPV a avut ponderea cea mai mare la grupa de vârstă 26-35 de ani iar asocierile de HR și LR HPV au avut ponderea cea mai mare la toate categoriile de vârstă.
50. Am constatat leziuni susceptibile de a fi determinate de HPV, la **63%** dintre bărbații investigați iar testele HPV au fost pozitive pentru **58%** dintre bărbații cu leziuni evidențiate prin peniscopie.
51. Pentru cuplurile investigate, **genotipurile concomitente de HPV** pe care le-am identificat au fost în ordinea frecvenței: **HPV16, 51, 18, 52, 66, 31 și 6.**
52. Am evidențiat că **41,5%** dintre partenerile bărbaților HPV pozitivi cu leziuni genitale au avut **citologii cu anomalii și 28% au avut leziuni cervicale.**

53. Am arătat că femeile din acest grup au fost **HPV pozitive** în **proporție de 83%** iar partenerii lor aveau leziuni peniene în proporție de 63%.

54. Am evidențiat că pentru 71 dintre partenerii bărbaților HPV pozitivi cu leziuni, s-a efectuat examen histopatologic pentru leziuni cervicale vizualizate la colposcopie. Am arătat că au fost diagnosticate 71 de leziuni cervicale, **două treimi dintre ele fiind leziuni de grad înalt, CIN2-3 iar o pacientă a fost diagnosticată cu carcinom microinvaziv. La partenerii bărbaților HPV pozitivi fără leziuni genitale, am arătat că numărul leziunilor CIN2-3 a fost de două ori mai mic.**

55. **Cele trei leziuni PIN1** evidențiate la bărbații din studiu au fost HPV pozitive pentru genotipuri asociate de HR și LR HPV iar HPV16 a fost prezent la un singur pacient.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Am efectuat un studiu prospectiv pe un lot de 732 de femei cu scopul de a evidenția că depistarea precoce a infecției cu HPV este esențială în prevenirea apariției cancerului de col uterin.

Pentru depistarea femeilor cu risc pentru cancerul de col uterin, am ilustrat că examenul citologic și testul HPV sunt complementare, citologia depistând existența unei leziuni iar testul HPV stabilind riscul de a dezvolta o leziune preneoplazică sau neoplazică.

Pe durata cercetării am construit un algoritm de monitorizare și intervenție pentru pacientele documentate cu infecție HPV.

Am inclus în studiu analiza unui lot de bărbați reprezentați de parteneri ai femeilor urmărite pe parcursul cercetării, în scopul de a evidenția dacă femeile ai căror parteneri sunt infectați cu HPV sunt mai expuse riscului de boală cervicală și am evidențiat acest lucru.

Lotul populațional pe care l-am urmărit a fost diferit de populația generală și nu toate datele acestui studiu pot fi generalizate dar am evidențiat frecvența crescută a infecției cu genotipuri HR HPV la femeile și bărbații pe care i-am avut în supraveghere și am arătat că HPV 16 este cel mai frecvent și mai persistent tip de HPV fiind implicat mai ales în cele mai severe leziuni ale colului uterin.

La sfârșitul studiului am constatat îmbunătățirea tuturor parametrilor urmăriți pe durata cercetării care au arătat scăderea riscului de îmbolnăvire.

Am arătat că tipurile vaccinale de HPV din ultimul vaccin anti HPV, Gardasil[®]9 sunt printre cele mai frecvente și la populația din România, cu excepția HR HPV45 și LR HPV11, ceea ce ar justifica utilizarea acestuia în programele de prevenție primară pe termen lung și în țara noastră.

Limitările studiului

Deși am avut în studiu paciente cu nivel de instruire înalt care aveau acces facil și permanent la un program de urmărire propus într-un cadru specializat și conform Ghidurilor de practică medicală, în condițiile gratuității serviciilor medicale pe durata cercetării, nu am avut participarea așteptată din partea tuturor pacientelor urmărite. Nu toate pacientele au respectat protocolul propus și complianța lor a fost redusă la propunerea de investigații plătite (testarea HPV) iar o parte au renunțat și au fost pierdute din urmărire.

ORIENTĂRI DE VIITOR

Deoarece am arătat că prevalența infecției HPV s-a menținut la un nivel ridicat în cursul cercetării dar și la sfârșitul ei, consider că vaccinarea anti HPV ar fi soluția pentru scăderea incidenței acestei infecții și a ratei de îmbolnăvire datorate achiziției și persistenței HPV.

Susțin continuarea Programului Național de Screening pentru Depistarea Cancerului de col uterin și sugerez analiza introducerii testării HPV ca metodă de screening pentru femeile eligibile, cu vârsta peste 30 de ani, în completarea screening-ului citologic.

Având în vedere caracterul profund prevenibil al cancerului de col uterin prin metode de profilaxie primară (educație, vaccinarea împotriva HPV) și respectiv secundară (identificarea precoce a bolii prin programe de screening populațional) și situația endemică din România (incidență și mortalitate cu cel mai ridicat nivel din UE) consider că se impun câteva priorități de intervenție pe termen scurt și mediu:

- a. dezvoltarea programului național de screening și extinderea sa la nivel populațional, astfel încât programul să se adreseze cu prioritate populației la risc,
- b. ameliorarea sistemului informațional privind acest program și legătura sa cu componenta terapeutică
- c. analiza posibilității de creștere a accesului și acceptabilității vaccinării HPV

- d. dezvoltarea unei componente importante de educație pentru sănătate în școli, la care să aibă acces sistematic toți copiii, cu accent pe sănătatea reproducerii, comportament sexual responsabil și importanța accesării serviciilor preventive, inclusiv a programelor de screening.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

2. Globocan Cervical Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence worldwide in 2012. Available at:http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
3. International Agency for Research on Cancer: IARC Handbook of Cancer Prevention Vol.10. Cervix Cancer Screening. Lyon :IARC Press;2005.
4. M.Arbyn, A.Anttila, J.Jordan, G.Ronco, U.Schenck, N.Segnan,H,et al.– European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition – Summary Document. Ann.2010Mar;21(3):448-58.
6. Yang BH, Bray F, Parkin DM, Sellors JW, Zhang ZF – Cervical Cancer as a priority for prevention in different world region: an evaluation using years of lifelost. Int J Cancer 2004;109(3):418-24.
7. Gondos A, Chokunonga E, Brenner H, Parkin DM, Sankila R, Borok MZ,et al.Cancer survival in a southern African urban population. Int J Cancer 2004;112(5):860-4.
8. Arbyn M. Trends of cervical cancer mortality in the members states of the European Union. Eur J Cancer. 2009;45:2640-48.
9. Syrjanen K. Exposure Time and Other Risk Factors of HPV: Biologic and Epidemiologic Aspects. In: Papillomavirus in Human Pathology. Vol 9. Challenges of Modern Medicine. Ed.Monsonogo J. 1995:76-83.
12. Miller AB. Cervical Cancer Screening Programmes: Managerial Guidelines. Geneva, Switzerland- World HealthOrganisation,1992.
13. Gustaffson L, Ponten J, Bergstrom R, Adamite O. International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. Cancer Causes Control 1997;8(5):755-763.
16. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human Papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. J Natl Cancer Inst.2011;103:368-83.

19. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55(4):244-65.
25. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from <http://globocan.iarc.fr>. Prevalence data: Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, 132(5):1133–45. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27711> PMID:22752881
46. Anghel R. Ghid de diagnostic și tratament al cancerului de col uterin. Comisia de Oncologie a Ministerului Sănătății, București 1999.
48. Apostol I, Baban A, Nicula F et al. Cervical cancer assessment in Romania under EUROCHIP-2. *Tumori*.2010;96:545-52.
51. Maver PJ, Seme K, Korac T. Cervical cancer screening practices in central and eastern Europe in 2012. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2013;22:7-19.
52. Altobelli E, Lattanzi A. Cervical Carcinoma in the European Union: An Update on Disease Burden. Screening Program State of Activation and Coverage as of March 2015. *Int J Gynecol Cancer*. 2015 March 2015;25(3):474-83.
56. Șuteu O, Irimie A, Nicula F, Coza D, Duma M, Pais R, Neamtiu L. Organization and implementation of cervical screening pilot program in county of Cluj, Transilvania. In: Monsonego J. Preventing and Controlling Cervical Cancer in the New Millenium. Preceeding of the 5th International Multidisciplinary Congress EUROGIN; 2003, Apr 13-16, Paris. France.2003:235-9.
57. Programul Național de Screening pentru Cancerul de col uterin. Ordinul ministrului sănătății nr .569/26.06.2012.
109. Fernando Cobo .Introduction and epidemiological data. In: Human Papillomavirus Infections. From the Laboratory to Clinical Practice. Fernando Cobo (ed). Pg:1-14. Published by Woodhead Publishing Limited 2012.