

# Applicazione clinica del test virale: Esperienza dello IEO

*Noemi Spolti*  
*Mario Sideri*



**ISTITUTO EUROPEO DI  
ONCOLOGIA  
Milano**

# USO DEL DNA PAP (HC2) in IEO (lug 2002-lug 2006)

- il primo studio ALTS (2002) ha evidenziato il valore predittivo negativo del DNA PAP (HC2)
- già nel luglio 2002, abbiamo deciso di introdurre il test virale nei protocolli clinici dell' IEO .

# INTRODUZIONE DEL DNA PAP (HC2) in IEO (lug 2002-lug 2006)

*Come è stato introdotto?*

- all'interno delle opzioni previste dalle linee guida consolidate nazionali
- sfruttando il valore predittivo negativo del test
- utilizzando HC2 e citologia convenzionale.

# Indicazioni all'utilizzo del test HC2 in IEO (lug 2002-lug 2006)

-Dove lo abbiamo applicato?

# Indicazioni all'utilizzo del test HC2 in IEO (lug 2002-lug 2006)

- nello screening delle donne di età superiore ai 30 anni in associazione al Pap test convenzionale
- nella gestione delle pazienti con Pap test positivo (ASC-US ed **L-SIL**)
- dopo la colposcopia per pap ASC-US e L-SIL quando non si siano riscontrate lesioni di alto grado
- nel follow up dopo terapia conservativa

*Screening delle donne di età  $\geq$  30 anni in  
associazione al Pap test convenzionale*

linee guida GISC  
PAP OGNI 3 ANNI

raccomandazioni società di ginecologia  
PAP ANNUALE

*Annosa diatriba!*

*Screening delle donne di età  $\geq$  30 anni in  
associazione al Pap test convenzionale  
nostro protocollo*

linee guida GISC

**DOPPIO TEST OGNI 3 ANNI**



Pap negativo/HC2 negativo

raccomandazioni società di ginecologia

**DOPPIO TEST ANNUALE**



Pap negativo/HC2 positivo

*L'annosa diatriba è finita!*

*Screening delle donne di età  $\geq$  30 anni in  
associazione al Pap test convenzionale  
nostro protocollo*

*Dal 2002 i dati pubblicati  
ci hanno dato ragione!*



## ***Sensitivity for CIN 2+***

<b><i>Population</i></b>	<b><i>No.</i></b>	<b><i>Pap</i></b>	<b><i>HPV</i></b>	<b><i>Comb</i></b>
<i>Germany</i>	7592	34%	86%	94%
<i>U.K.</i>	10,358	72%	97%	100%
<i>Mexico</i>	6115	57%	94%	98%
<i>Costa Rica</i>	6176	80%	86%	92%
<i>South Africa</i>	2925	74%	85%	87%
<i>China</i>	1936	94%	98%	100%
<i>Baltimore</i>	1040	60%	100%	100%

*Wright et al. (2004) Obst Gynecol*

# DNA PAP (HC2) nello screening studio NTCC

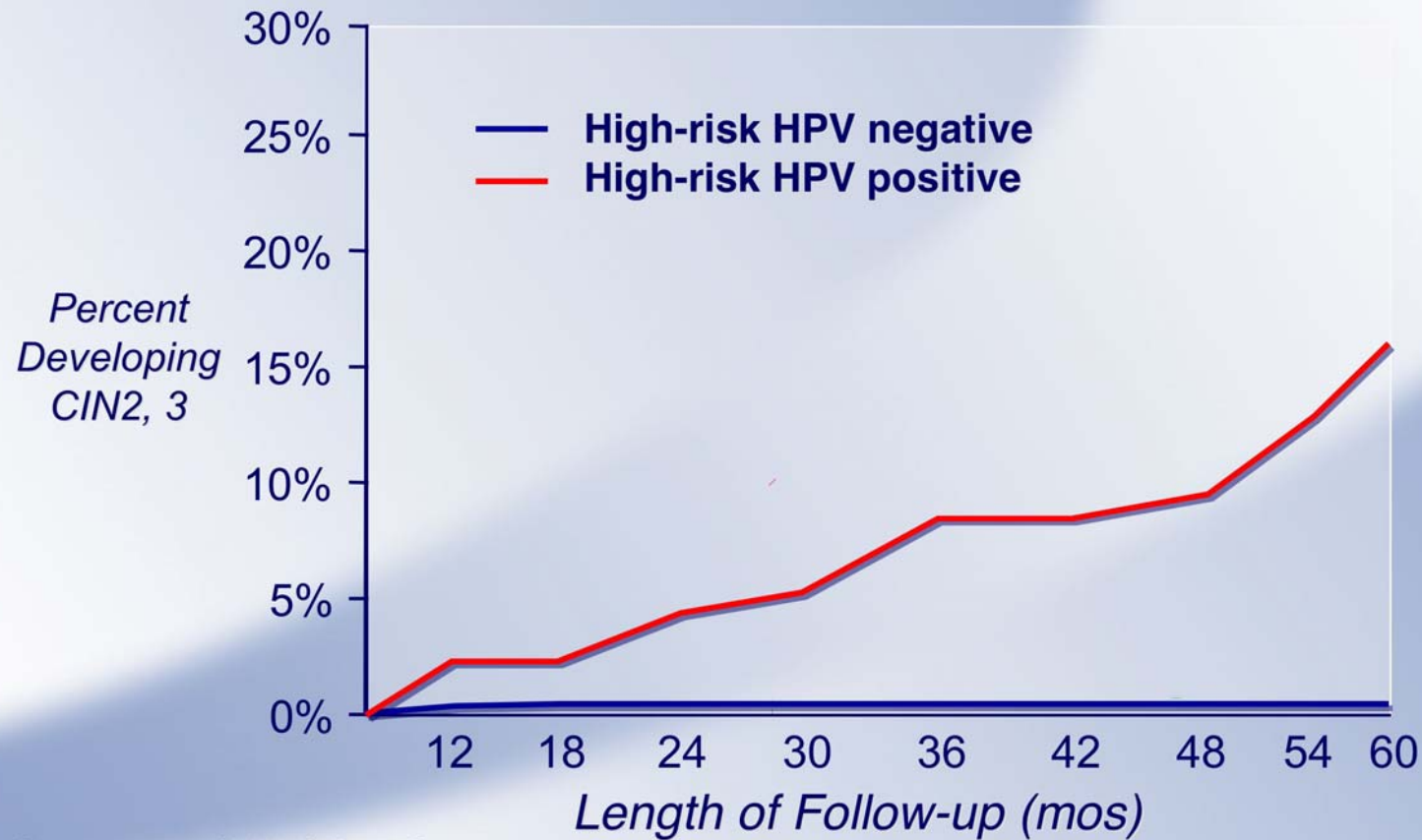
Lo studio italiano del GISCi condotto su 33.364 donne nello screening primario ha evidenziato che l'uso del DNAPAP in associazione al Pap Test tradizionale ha permesso di identificare il 40% in più di lesioni di alto grado sfuggite al pap test.

Ronco et al , JNCI 2006

*DATI ITALIANI:  
Studio GISCI (NTCC)  
N° casi = 33.364*

HPV testing alone was more sensitive than conventional cytology among women 35 - 60 years old (rel sens 1.47). Adding liquid-based cytology improved sensitivity only marginally but increased false-positives.

## Development of CIN 2,3 on Follow-up



Clavel et al. (2004) Br J Cancer

*Screening delle donne di età  $\geq$  30 anni in associazione al Pap test convenzionale*

**ACOG practice bulletin 2005:  
Women negative on Pap and HC2**

"The natural history of the disease and several longitudinal studies suggest that women with negative Pap and negative HPV tests results could avoid rescreening for 3 years even if they have new sexual partners."

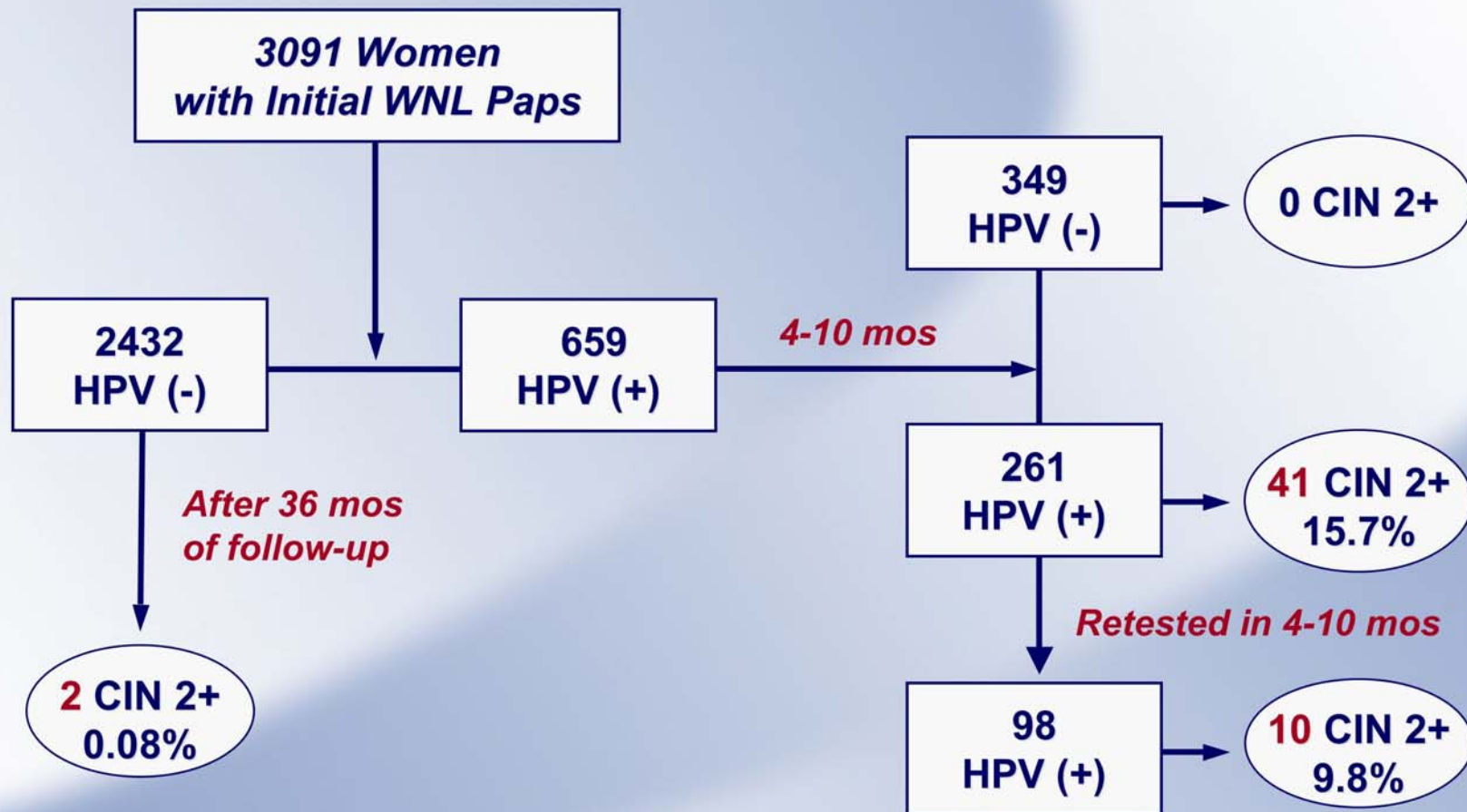
*Screening delle donne di età  $\geq$  30 anni in associazione al Pap test convenzionale*

**HPV positivo Pap Test negativo**

*Quale gestione?*

*Nostro protocollo*

- controllo a 1 anno con doppio test (pap/HC2)
- colposcopia se persistentemente HC2 positivo



Bory et al. (2002) *Int J Cancer*

# *Management of HPV Results*

---

*Risk of CIN 2,3 after 36 mos:*

<i>HPV DNA (-)</i>	<i>0.08%</i>
<i>HPV DNA (+) - once</i>	<i>7.7%</i>
<i>HPV DNA (+) - at least 2x</i>	<i>21.2%</i>

*Bory et al. (2002) Int J Cancer*



*Screening delle donne di età  $\geq$  30 anni in associazione al Pap test convenzionale*

**PROBLEMI?**

- La paziente vuole venire e fare il Pap test ogni anno!
- Tempo in ambulatorio per spiegare il nuovo test (counseling)
- Tempo al ricevimento di un DNA Pap positivo

# *Gestione delle pazienti con Pap test positivo (ASC-US ed L-SIL)*

*linee guida SICPCV*

**Ripetizione pap a 6 mesi**

*oppure*

**Colposcopia immediata**

***Annosa diatriba!***

*Triage delle pazienti con Pap test positivo  
(ASC-US ed L-SIL)*

*Protocollo IEO*

*linee guida SICPCV*

**Ripetizione pap a 6 mesi**

**→ DNA PAP negativo**

*oppure*

**Colposcopia subito**

**→ DNA PAP positivo**

*L'annosa diatriba è finita!*

# Virologic Versus Cytologic Triage of Women With Equivocal Pap Smears: A Meta-analysis of the Accuracy To Detect High-Grade Intraepithelial Neoplasia

*Marc Arbyn, Frank Buntinx, Marc Van Ranst, Evangelos Paraskevaidis, Pierre Martin-Hirsch, Joakim Dillner*

Journal of the National Cancer Institute, Vol. 96, No. 4, February 18, 2004

## EDITORIAL *Have We Resolved How To Triage Equivocal Cervical Cytology?*

*Diane Solomon, Mark Schiffman* JNCI, 96, 4; February 18, 2004

***Conclusioni: La metanalisi dimostra che il triage con test virale è superiore alla citologia ripetuta nel selezionare i casi da inviare alla colposcopia.***

# HPV test nel pap L-SIL?

Nelle pazienti > 30 anni  
60% di positività; utile  
quindi il triage con HC2

*Dopo la colposcopia per pap ASC-US e L-SIL quando  
non sono riscontrate lesioni di alto grado*

*linee guida SICPCV*

**Ripetizione colposcopia e Pap Test  
a 6 mesi**

*Dopo la colposcopia per pap ASC-US e L-SIL  
quando non sono riscontrate lesioni di alto grado  
Protocollo IEO*

*linee guida SICPCV*

Ripetizione colposcopia e pap a 6 mesi

➔ DNA PAP positivo

Ripetizione pap e DNA PAP a 12 mesi

➔ DNA PAP negativo

*Rischio di CIN3 in donne inizialmente inviate alla colposcopia per pap ASCUS/HC2+ oppure L-SIL senza evidenza di CIN2-3*

*Dati studio ALTS al termine di 2 anni di follow up:*

- 11,7% nel gruppo non biopsiato
- 11,3% nel gruppo con biopsia negativa
- 13% nel gruppo con CIN1



# *ACOG Practice Bulletin 2005*

Circa il 10% delle donne con Pap test ASCUS/HC2+ o L-SIL in cui non è stata evidenziata una lesione di alto grado alla colposcopia iniziale, sviluppa un CIN3 entro 2 anni.

# Confronto tra HC2 a 12 mesi, pap a sei mesi e Pap a 12 mesi nelle pazienti con pap ASCUS o LSIL negative per CIN2/3 alla colposcopia iniziale

Tipo test	Sensibilità per CIN2/3	% pz inviate alla colpo
HPV test a 12 mesi	92%	53%
Pap test 6 mesi	77%	52%
Pap test 12 mesi	88%	64%

# *Follow up dopo terapia conservativa*

## *Linee guida internazionali sul follow up dopo trattamento*

- SICPCV (2002): citologia e colposcopia ogni 6 mesi per due anni
- ASCCP Practice Guidelines (2002): citologia  $\pm$  colposcopia ogni 6 mesi per due anni
- Linee guida olandesi (1995): citologia a 6, 12, 24 mesi dopo il trattamento
- Linee guida inglesi (1992): 6 pap in 5 anni dopo il trattamento

*Protocollo IEO di fwup (2002 - ....)  
Pap ed HC2, senza colposcopia a 9 mesi dal  
trattamento*

*Sulla base dell'esito dei due test:*

- pap e HPV DNA negativo: controllo a 12 mesi: se negativo controllo ogni 24 mesi
- pap e HPV DNA positivo: colposcopia
- pap negativo e HPV DNA positivo: controllo a 6 mesi
- pap positivo (ASC-US/L-SIL) e HPV DNA negativo: controllo a 6 mesi
- pap positivo H-SIL e HPV DNA negativo: colposcopia
- discrepanti persistenti a sei mesi → colposcopia

# HPV test dopo il trattamento ?

- Il test HC2 ha una **sensibilità superiore** alla citologia nell'identificare la persistenza o ricorrenza delle lesioni. I due tests associati hanno una sensibilità del 96%. (Zielinski, 2004)
- Elevato **valore predittivo negativo** (Costa, Gynecol Oncol, 2001)
- Solo le pazienti con **persistente** positività per HPV DNA sviluppano una recidiva (Nagay, Gynecol Oncol 2000 - Paraskevaidis, Ostet Gynecol 2001)
- "per le donne con citologia ed HPV DNA test negativi la **frequenza** del follow-up può essere **ridotta**" (Debarge, Gynecol Oncol 2003)

*Protocollo IEO di fwup (2002 - ....)*  
*Pap ed HC2*  
*Colposcopia solo se positività*

- il doppio test porta ad un aumento di falsi positivi?
- quante sono le pazienti che finiscono per fare 3 test, pap, HC2 e colposcopia?

# *La percentuale di positività diminuisce col tempo dal trattamento*

	PAP +	hc2 +
18 months 190 pts	17% (n=33)	23% (n=44)
18-36 months 105 pts	9.5% (n=10)	21% (n=23)
> 36 months 63 pts	11% (n=7)	17% (n=11)
TOTAL 358 pts	14% (n=50)	21% (n=78)

# COMBINED RESULTS PAP & hc2

6-18 months after surgery (190 pts)

	hc2 -	hc2 +
PAP -	69% (n=130)	14% (n=27)
PAP + LSIL/ASC-US	6% (n=12)	8% (n=15)
PAP + HSIL	2% (n=4)	1% (n=2)

12mo

6mo

colpo



# ***COMBINED RESULTS PAP & hc2***

**6-18 months after surgery**

- 70% fwup at 12 months
- 20% fwup at 6 months
- 10% colposcopy

# COMBINED RESULTS PAP & hc2

18-36 months after surgery (105 pts)

	hc2 -	hc2 +
PAP -	74% (n=78)	16% (n=17)
PAP + LSIL/ASC-US	2% (n=2)	5% (n=5)
PAP + HSIL	2% (n=2)	1% (n=1)

24mo

6mo

colpo

# ***COMBINED RESULTS PAP & hc2***

**18-36 months after surgery**

- 75% fwup at 24 months
- 18% fwup at 6 months
- 7% colposcopy

# *Protocollo IEO di fwup (2002 - ....)*

## *Pap ed HC2, senza colposcopia*

- il doppio test non porta ad un aumento di falsi positivi, anzi migliora la specificità del pap test
- le pazienti che finiscono per fare 3 test, pap, HC2 e colposcopia, sono meno del 10%

# *HPV test : il futuro*

## *protocollo IEO, luglio 2006 - .....*

- il protocollo precedente ha utilizzato il valore predittivo **negativo** del test HC2
- l'evoluzione futura è diretta a caratterizzare meglio il **positivo** HC2
- vi sono alcuni dati iniziali, ma forse è ancora presto per poter trarre conclusioni definitive
- tuttavia abbiamo ipotizzato un algoritmo gestionale che tenga conto della genotopizzazione 16 e 18, e della rilevazione di E6/E7 mRNA

# PROTOCOLLO IEO

## INDICAZIONI per la GENOTIPIZZAZIONE

### Screening opportunistico delle donne di età superiore ai 30 anni

Per le pazienti con pap negativo e HC2 positivo la genotipizzazione può essere utile per rimandare ad un controllo più ravvicinato (6 mesi) le donne con i tipi 16 e/o 18; se il successivo controllo conferma la persistenza dello stesso tipo virale è indicata la colposcopia.

Per le altre donne si seguirà l'iter in uso per le donne HC2 positive cioè controllo ad 1 anno con doppio test .

# PROTOCOLLO IEO

## INDICAZIONI per la GENOTIPIZZAZIONE

**Nelle pazienti inviate alla colposcopia perché ASC-US (HC2 positivo) oppure con pap test LSIL**

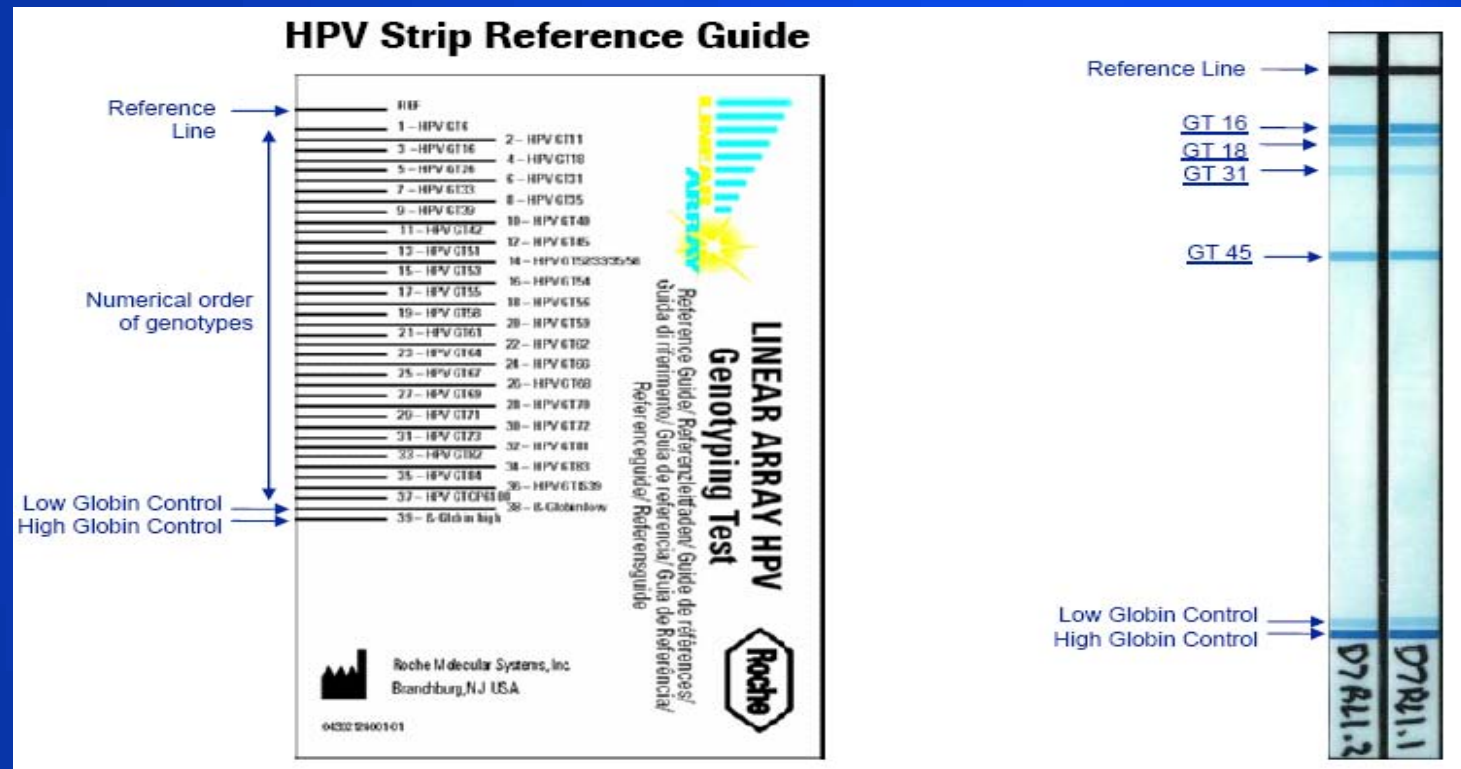
Le donne positive ai tipi 16 e/o 18 sono inviate a sei mesi, mentre le donne positive ai restanti tipi virali possono essere inviate al follow-up ad un anno, come per le donne HC2 negative.

Nelle donne persistentemente HC2 positive la genotipizzazione è utile al fine di comprendere se la persistenza è riferita sempre allo stesso tipo virale.

# Test di genotipizzazione virale

## Linear Array (Roche diagnostic) Reverse hybridization

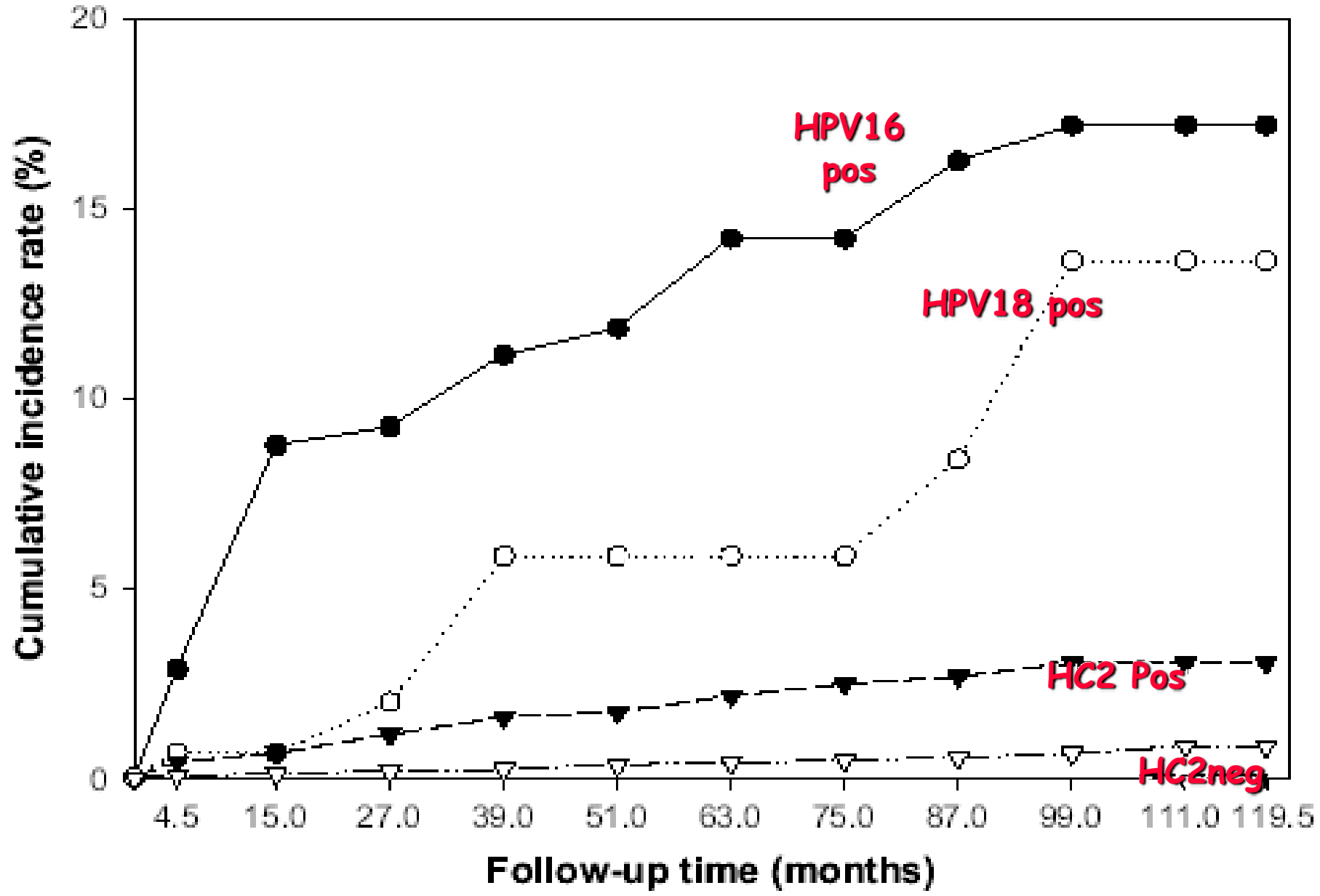
Striscia sulla quale sono immobilizzate in linee parallele sonde genotipo-specifiche (LiPA, LBA, LA)  
Il prodotto della PCR viene aggiunto  
Genotipo identificato con la lettura/interpretazione visiva della striscia: adatto in infezioni multiple





# Khan et altri JNCI 2005

20810 donne sottoposte a HC2  
se positive testate per HPV 16 e 18  
seguite per 10 anni per valutare il rischio  
di sviluppo di CIN3

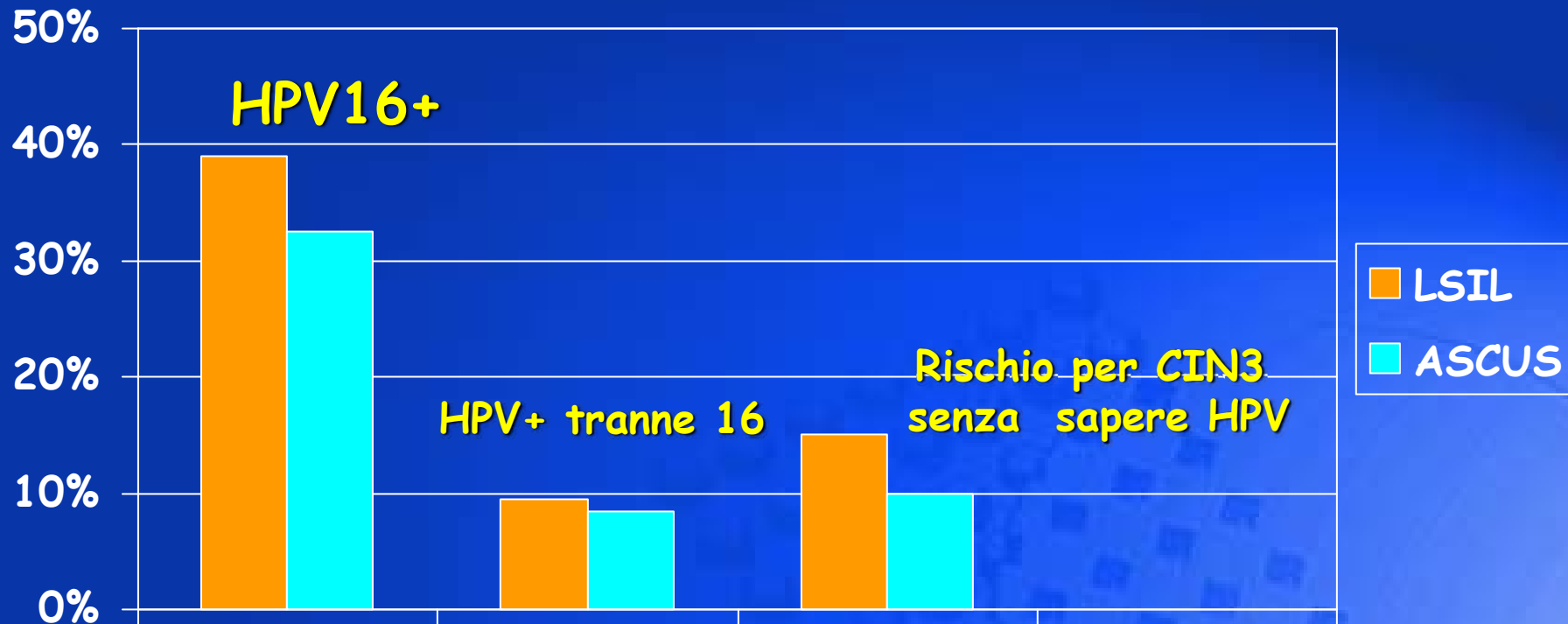


**Incidenza di CIN3 in 10 anni in funzione di un unico test virale positivo con citologia negativa**

# La genotipizzazione 16-18 in ASC-US ed L-SIL

- Valutato il rischio per  $CIN_{\geq 3}$  a 2 anni in pazienti ASCUS o LSIL attribuibile alla presenza di HPV 16 vs altri HR HPV .
- 4915 pazienti
- Hc2 , PCR PGMY09/11, line blot per genotipo

# Rischio per CIN3 in donne pos per HPV16 con Pap test ASCUS o LSIL



Castle, J Natl Cancer Inst 2005

# CIN3 e tumore associati a HPV status all'ingresso (ASC-US e L-SIL)

HPV risk category	OR (95%CI)	P
HPV-	1.0 (referent)	
Nononcogenic HPV+	2.6 (1.2-5.6)	0,02
HPV16-/HR HPV+	7.4 (4.2-13)	<0.001
HPV16+	38 (22-68)	<0.001

# Ricerca dell'espressione degli oncogeni E6/E7 tipo specifica Pre-TECT proofer (Alfa Wassermann )

Donne con infezione attiva da HPV esprimono gli Oncogeni E6/E7, che sono direttamente coinvolti nella trasformazione maligna, a seguito della interazione con p53 e RB

Test che vadano a rilevare la presenza di trascritti mRNA di E6/E7 potrebbero avere valore prognostico identificando una lesione che può, con maggior probabilità, persistere o progredire .

# PreTect HPV Proofer

- ✓ Identifica mRNA di 5 differenti HR HPV(16, 18, 31, 33 e 45)
- ✓ Non rivela la presenza di virioni (no DNA)
- ✓ Non è età-dipendente
- ✓ Pochi studi disponibili

# Protocollo IEO ricerca E6/E7

Pazienti con CIN1 istologico, HC2 positive vengono inviate al trattamento se Pre-tect Proofer positive



# Sensibilità, specificità di Pre tect HPV proofer e PCR nell'individuare i CIN2+ in 2 anni di follow up per Pap test ASCUS e LSIL

	PreTECT HPV proofer	(95% CI)	Gp5+/6+PCR	(95% CI)
Sensibilità	85,7%	42,1-99,6	85,7%	42,1-99,6
Specificità	<b>84,9%</b>	73,9-92,5	50%	37,4-62,6
VPP	37,5%	15,2-64,6	15,4%	5,9-30,5
OR	<b>69,8</b>	4,3-1137,3	5,7	0,6-52

# Conclusioni

Dal 2002 nuovi studi hanno confermato l'impiego dell'HC2 per selezionare i negativi mentre sono entrati in uso test molecolari per stratificare il rischio della paziente HC2 positiva





# Conclusioni

L'introduzione di nuovi test sempre piu' specifici porterà ad una rivisitazione dell'approccio allo screening e al triage dei positivi .  
Dovremo gradualmente abituarci a ragionare in termini di stima del rischio di possibile sviluppo di lesione sfruttando la migliore specificità e il valore predittivo positivo offerti dai nuovi tests.