

D.Gustinucci<sup>1</sup>, P. Giorgi Ross<sup>2</sup>, E.Cesarini<sup>3</sup>, M. Broccolini<sup>1</sup>, S.Bulletti<sup>1</sup>, A.Carlini<sup>1</sup>, V.D'Angelo<sup>1</sup>, M.R.D'Amico<sup>1</sup>, E.Di Dato<sup>1</sup>, P.Galeazzi<sup>1</sup>, M.Malaspina<sup>1</sup>, N.Martinelli<sup>1</sup>, N.Spita<sup>1</sup>, B.Tintori<sup>1</sup>, M.D. Giaino<sup>4</sup>, Basilio Passamonti<sup>1</sup>.

1) Azienda USL Umbria 1 Perugia, Laboratorio Unico di Screening, Direttore Dott. Basilio Passamonti  
 2) Servizio Interaziendale di Epidemiologia, AUSL and AO Santa Maria Nuova – IRCCS, Reggio Emilia  
 3) Beneficiaria di un aiuto individuale per la realizzazione di progetti di ricerca Co-finanziato dal Fondo Sociale Europeo (FSE) nell'ambito del Programma Operativo Regionale (POR) Umbria, FSE\*Obiettivo Competitività Regionale e Occupazione\* 2007-2013  
 4) Responsabile Servizio Prevenzione, Sanità Veterinaria e Sicurezza Alimentare Regione Umbria

**Obiettivi:** L'HPV come test di screening primario necessita di strategie di triage per ridurre l'invio in colposcopia. Ad oggi l'unico test raccomandato per il triage delle donne HPV positive è la citologia. In questo studio prospettico abbiamo testato l'accuratezza come test di triage della tipizzazione per HPV16 e HPV18, l'overespressione p16<sup>INK4a</sup>/Ki67 e di mRNA E6/E7 di cinque tipi di HPV ad alto rischio (16,18,31,33,45) e l'accuratezza di diverse combinazioni di questi biomarcatori con la citologia.

**Metodi:** Sono state reclutate 6272 donne invitate per un round di screening con test HPV primario. Le donne sono state testate per l'HPV con il test Cobas 4800 (Roche Diagnostics) con tipizzazione parziale (HPV16,18 e altri tipi ad alto rischio 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56,58, 59, 66 e 68) utilizzando il sistema Cobas PCR cell collection media (Roche Molecular Systems). Sono risultate positive 396 donne che sono state testate per la citologia (ThinPrep 2000 System-Cytec Corporation) con 392 risultati validi, per p16<sup>INK4a</sup>/Ki67 (CINtec plus cytology-Roche mtm laboratories) con 375 test validi e per mRNA E6/E7 (NucliSENS EasyQ HPV-Biomerieux) con 305 test validi.

Tutte le donne HPV positivo-citologia anomala (141) sono state inviate immediatamente in colposcopia; le donne HPV positivo-citologia negativa (251) sono state sottoposte al follow-up ad un anno con test HPV (211 donne tornate) ed inviate in colposcopia solo se l'HPV era persistente (117) (Fig.1). I 117 HPV positivi sono stati testati con mRNA E6/E7 e con p16<sup>INK4a</sup>/Ki67 (Tabella 1).

L'end-point era CIN2+ alla prima colposcopia, al baseline o ad un anno di follow-up.

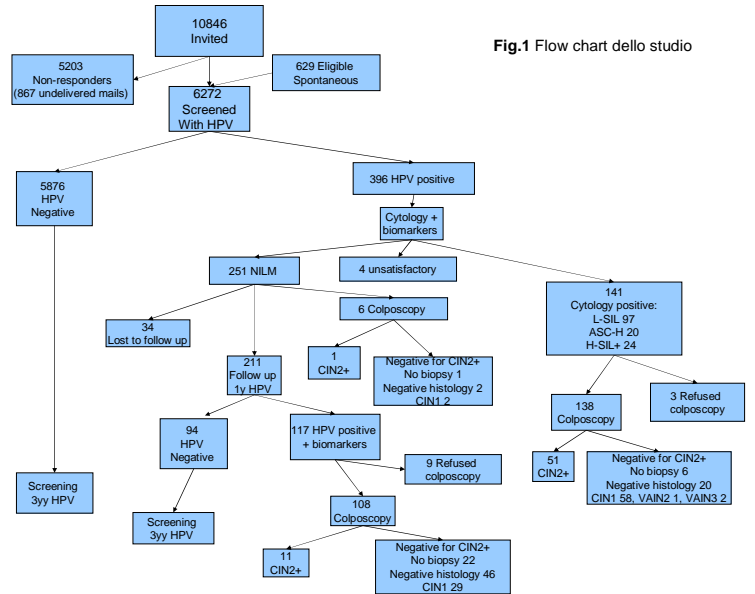


Fig.1 Flow chart dello studio

**Risultati:** La sensibilità è stata: 77,6% per la citologia ASCUS/LSIL; 53,2% per la citologia di alto grado; 47,0% per la tipizzazione HPV16-18; 87,6% per p16<sup>INK4a</sup>/Ki67 e 80,8% per mRNA E6/E7.

Il tasso di positività era: 36% per la citologia ASCUS/LSIL; 11,2% per la citologia di alto grado; 26,3% per la tipizzazione HPV16-18; 36,0% per p16<sup>INK4a</sup>/Ki67 e 47,5% per mRNA E6/E7 (Tabella 1 e Fig. 2).

Tabella 1: Risultati dal baseline dei tre test di triage nelle 211 donne HPV positive citologia negativa ad 1 anno di follow-up: persistenza dell'HPV ad un anno e incidenza di CIN2+

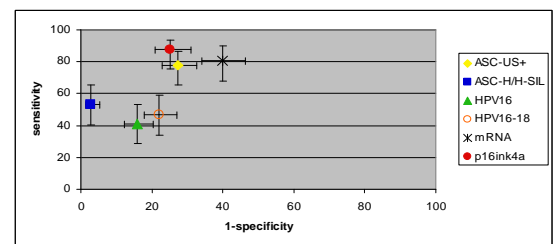
Baseline results	Total HPV-positive cytology-negative		Presented at follow up		HPV positive		biomarker result at 1 year follow up (N(positive)/N(tested))		colposcopy done		CIN2+ PPV %	
	N	N	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
HPV16	positive	43	35	81.4	22	62.9	20	90.9	3	15.0	3	15.0
	negative	208	176	84.6	95	54.0	89	93.7	8	9.0	8	9.0
HPV16 or 18	positive	53	44	83.0	27	61.4	25	92.6	3	12.0	3	12.0
	negative	198	167	84.3	90	53.9	83	92.2	8	9.6	8	9.6
mRNA	positive	72	59	81.9	39	66.1	23/28	82.1	36	92.3	5	** 13.9
	negative	116	99	85.3	49	49.5	9/32	28.1	45	90.0	2	** 4.4
p16	positive	54	40	74.1	30	75.0	17/24	72.0	26	86.7	7	** 26.9
	negative	185	159	85.9	78	48.1	25/61	42.6	73	92.4	3	** 4.1

\* PPV= Valore Predittivo Positivo

\*\* 6 CIN2 su 8 erano mRNA E6/E7 positivi al follow up ad un anno;

9 CIN2 su 9 erano positivi alla p16<sup>INK4a</sup>/Ki67 al follow up ad un anno

Fig.2: Sensibilità e specificità nel triage delle donne HPV positive

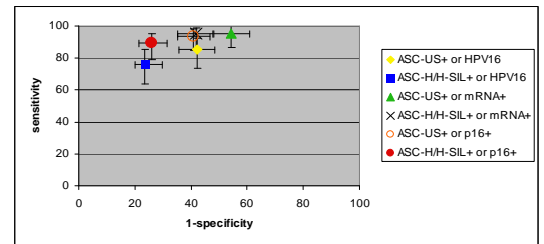


Le strategie combinate di citologia e p16<sup>INK4a</sup>/Ki67 o mRNA E6/E7 (ASCUS+ o ASCH+ e biomarcatori) hanno raggiunto una sensibilità vicina al 100% anche con citologia di alto grado (Fig.3) e con end-point CIN3+ (Tabella 2).

Tabella 2: Sensibilità per CIN3+ nelle diverse strategie di triage nelle donne HPV positive

	Total tested women	Test positive N	Colposcopy referral N	Total CIN3+ N	Detected CIN3+ N	Sensitivity for CIN3+ %	95% CI
cytology	ASC-US+	392	141	36.0	27	28	96.3 81.0 99.9
	ASC-H/SIL	392	44	11.2	27	20	74.1 53.7 88.9
typing	HPV16	396	80	20.2	27	19	69.8 39.3 74.6
	HPV16-18	396	104	26.3	27	17	63.0 42.4 80.6
mRNA	305	145	47.5	22	19	86.4 65.1 97.1	
p16ink4a	375	135	36.0	26	24	92.3 74.9 99.1	
Cytology + typing	ASC-US+ or HPV16	392	194	49.5	27	27	100 89.5 100
	ASC-H/SIL+ or HPV16	392	127	32.4	27	25	92.6 75.7 99.1
Cytology + mRNA	ASC-US+ or mRNA+	301	185	61.5	22	22	100 87.3 100
	ASC-H/SIL+ or mRNA+	301	155	51.5	22	22	100 87.3 100
Cytology + p16	ASC-US+ or p16+	371	186	50.1	26	26	100 89.1 100
	ASC-H/SIL+ or p16+	371	137	36.9	26	25	96.2 80.4 99.9

Fig.3: Sensibilità e specificità delle strategie combinate nel triage delle donne HPV positive



**Conclusioni:** La citologia di triage come test di triage ha dato risultati molto buoni. I biomarcatori per essere competitivi devono essere convenienti in termini di costi o di impatto organizzativo. Le strategie combinate di citologia e biomarcatori raggiungono sensibilità molto elevate per lesioni prevalenti e potrebbero consentire intervalli più lunghi nelle donne HPV positivo-triage negativo.