



Valutazione dell'HPV DNA e mRNA test nel follow-up post-trattamento conservativo per CIN2/3 nello screening dell'Emilia Romagna

Daniela Barbieri¹, Silvano Costa², Adriana Falasca², Patrizia Terzano², Paola Garutti³, Paolo Cristiani⁴, Elena Marra⁵, Maria Paola Landini¹ e Simona Venturoli^{1*}.

¹Azienda Ospedaliero-Universitaria S.Orsola-Malpighi, U.O. Microbiologia, Bologna; ²Azienda Ospedaliero-Universitaria S.Orsola-Malpighi, U.O. Ginecologia, Bologna; ³Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Arcispedale S.Anna, Ferrara; ⁴Unità Screening del Carcinoma Cervicale, Azienda USL di Bologna. ⁵U.O. Ostetricia e Ginecologia, Azienda USL di Imola.

*e-mail: simona.venturoli@unibo.it

Area di pertinenza n.4: Biomarcatori, Test molecolari

PREMESSE ed OBIETTIVI:

Le linee guida nazionali ed internazionali raccomandano l'uso dell'HR HPV-DNA test unitamente alla citologia nel follow-up (FU) post-trattamento conservativo per CIN2/3.

HR HPV-DNA test nel FU ha mostrato una elevata sensibilità per la rilevazione di malattia residua o recidiva, tuttavia a fronte di un elevato NPV, ha presentato una bassa specificità.

Da un nostro precedente studio (Venturoli et al. 2008) è emerso che più dell'80% delle persistenze/recidive di CIN2+ risultava positiva per i genotipi 16 e 18 e che l'identificazione del genotipo persistente ha il potenziale di migliorare la gestione delle pazienti

In questo studio, abbiamo voluto verificare se la **genotipizzazione virale** ed il riscontro degli **mRNA E6/E7** siano in grado di favorire l'identificazione delle donne a rischio di persistenza/recidiva di malattia.

Fine ultimo è la valutazione dell'impiego di test molecolari per l'ottimizzazione dei protocolli nel FU delle donne sottoposte a conizzazione.

METODI:

Nello studio sono state incluse **118 donne** (età 23-67 anni, media 38,0 ±10,3 anni, mediana 36 anni) aderenti allo screening del cervicocarcinoma della Regione Emilia-Romagna (ASL di Bologna, USL di Bologna e Ferrara) negli anni 2008-2012, seguite in un **FU a 24 mesi** (controlli intermedi ogni 6 mesi; tempo medio di FU 19,7 mesi; 83,9% delle pazienti seguite a 18 mesi) con:

- Pap-test
- colposcopia
- biopsia ove necessario
- test per la ricerca e genotipizzazione dell'HPV DNA
- test per la ricerca dell'mRNA delle oncoproteine virali E6/E7

Abbiamo utilizzato le seguenti tecniche di biologia molecolare:

• **GENOTIPO VIRALE** (INNO-LiPA® HPV, *Innogenetics*) → test che permette la genotipizzazione di 28 diversi genotipi di HPV (HPV ad alto e probabile alto rischio oncogeno: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82; HPV a basso rischio oncogeno: 6, 11, 40, 43, 44, 54, 70; altri HPV: 69/71, 74).

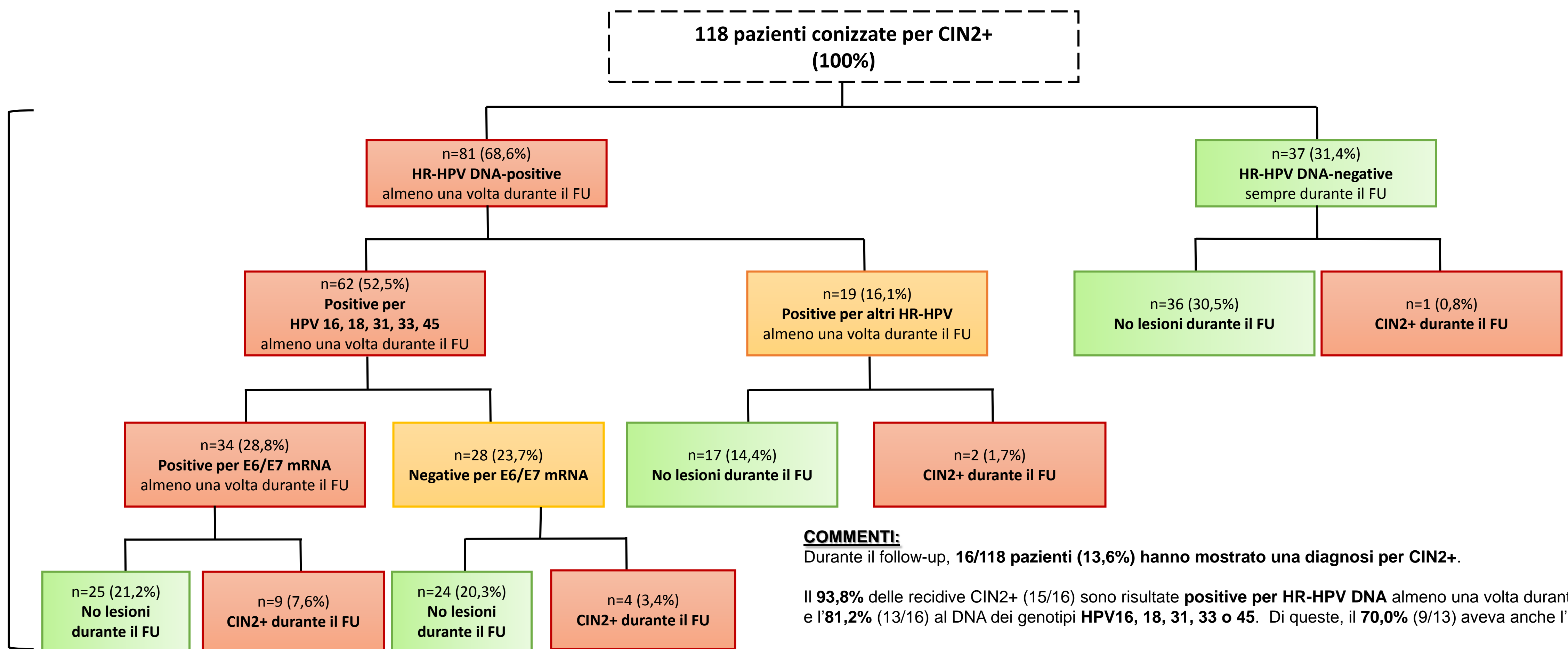
• **ESPRESSIONE** delle oncoproteine virali **E6/E7** (NASBA EasyQ, *Biomerieux*) → tecnica per l'amplificazione isoterma di target RNA E6/E7 con identificazione degli RNA di HR-HPV 16, 18, 31, 33 e 45 mediante l'uso di sonde *molecular beacons*.

Gli acidi nucleici usati per le analisi molecolari descritte sopra sono stati estratti a partire da campioni citologici raccolti in soluzione PreservCyt mediante il sistema EasyMag, *Biomerieux*.

Tabella 1: Risultati HPV DNA test al momento del trattamento (T0) e ad ogni intervallo del FU

	T0		FU1 (6 mesi)		FU2 (12 mesi)		FU3 (18 mesi)		FU4 (24 mesi)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HPV DNA test										
HPV DNA negative	2	1.7	49	41.5	55	49.1	62	63.3	41	69.5
HPV DNA positive	116	98.3	69	58.5	57	50.9	36	36.7	18	30.5
Totale pazienti	118	100	118	100	112	100	98	100	59	100
HR/PHR-HPV	116	98.3	64	54.2	52	46.4	34	34.7	18	30.5
LR/UR-HPV (soli)	0	0	5	4.2	5	4.5	2	2.0	0	0
HPV16 (da solo o con altri)	62	52.5	29	24.6	21	18.6	19	19.4	8	13.5
HPV18 (da solo o con altri)	8	6.8	3	2.5	5	4.5	0	0	0	0
HPV16 e 18	1	0.8	1	0.8	1	0.9	0	0	0	0
Altri HR/PHR-HPV (senza HPV16 e 18)	47	39.8	33	28.0	27	2.4	15	15.3	10	17.0

Follow-up 24 mesi



COMMENTI:

Durante il follow-up, **16/118 pazienti (13,6%)** hanno mostrato una diagnosi per CIN2+.

Il **93,8%** delle recidive CIN2+ (15/16) sono risultate **positive per HR-HPV DNA** almeno una volta durante il FU e l'**81,2%** (13/16) al DNA dei genotipi **HPV16, 18, 31, 33 o 45**. Di queste, il **70,0%** (9/13) aveva anche l'**mRNA virale**.

La positività ad HR-HPV DNA e all'mRNA E6/E7 è stata sempre riscontrata **prima o contemporaneamente** alla diagnosi istologica positiva per CIN2+.

Tabella 2: Esito del Pap Test in funzione dell'istologia durante il FU

	Durante il FU				Totale righe	p-value Fisher's exact test
	Esito Pap Test					
	Neg	ASCUS	LSIL	HSIL/SCC		
Istologia (Bio/Cono)						
No lesione o CIN1	49	25	25	3	102	<0,01
Lesione CIN2+	1	4	3	8	16	
Totale colonne	50	29	28	11	118	
Specificità per CIN2+	48,0% [95%CI:38,6%;57,6%]					
Sensibilità per CIN2+	93,8% [95%CI:69,7%;99,9%]					
PPV	22,1% [95%CI:13,7%;33,4%]					
NPV	98,0% [95%CI:88,5%;99,9%]					

Tabella 3: Esito dell'HR-HPV DNA test e dell'mRNA E6/E7 test in funzione dell'istologia durante il FU

	Durante il FU			p-value Fisher's exact test	Durante il FU				Totale righe	p-value Fisher's exact test
	HR/PHR-HPV DNA	Totale righe			HR-HPV DNA + E6/E7 mRNA					
	Neg ^a	Pos		Pos + Pos	Pos + Neg	Neg + Neg	Pos + NV ^b			
Istologia (Bio/Cono)										
No lesione o CIN1	36	66	102	<0,05	25	24	36	17	102	<0,05
Lesione CIN2+	1	15	16		9	4	1	2	16	
Totale colonne	37	81	118		34	28	37	19	118	
Specificità per CIN2+	35,3% [95%CI:26,7%;44,9%]				70,6% [95%CI:60,1%;79,3%]					
Sensibilità per CIN2+	93,7% [95%CI:69,7%;99,9%]				64,3% [95%CI:38,6%;83,8%]					
PPV	18,5% [95%CI:11,4%;28,5%]				26,5% [95%CI:14,4%;43,3%]					
NPV	97,3% [95%CI:84,9%;99,9%]				92,3% [95%CI:82,6%;97,1%]					

^apazienti HPV DNA-negative e LR/UR-HPV DNA-positive.

^bEscluse dai calcoli perché genotipi HR-HPV non valutabili (NV) con la metodica NASBA per l'mRNA virale.

Combinazione («AND rule») di Pap Test e HR-HPV DNA test:

Sensibilità per CIN2+= 88,4% Specificità per CIN2+= 66,2%

Combinazione («AND rule») di Pap Test, HR-HPV DNA test e mRNA test:

Sensibilità per CIN2+= 60,2% Specificità per CIN2+= 84,9%

CONCLUSIONI:

- Poiché la maggior parte delle CIN2+ riscontrate durante il FU è risultata positiva per HR-HPV DNA dei genotipi HPV16, 18, 31, 33 o 45 prima o contemporaneamente alla diagnosi, la genotipizzazione virale sembra essere utile per identificare le donne con maggiore rischio di recidiva di malattia a seguito di trattamento conservativo.
- L'elevata specificità della combinazione dei test HPV-DNA e mRNA, da soli (70,6%) o con il Pap test (84,9%), nel FU delle pazienti sottoposte a terapia conservativa per CIN2+ potrebbe avere un'importante ricaduta nello screening del cervico-carcinoma potendo diminuire i controlli per le pazienti a basso rischio e concentrare le risorse su quelle ad alto rischio di recidiva/persistenza.