Risultati dello studio molecolare abruzzese

Dott.ssa Maria Antonietta Venditti
U.O. Aziendale di Screening
Ospedale Serafino Rinaldi Pescina (AQ)

-for the PALMS Study Group-

Informativa

I servizi dei laboratori correlati a questo studio clinico sono stati rimborsati all’istituzione cui l'autore appartiene come uno dei centri di studio del processo PALMS.

TUMORE DELLA CERVICE UTERINA

L' HPV È LA CAUSA DEL 99,7 % DEI CASI DI TUMORE DELLA CERVICE.

- Il cancro cervicale è, a livello mondiale, il secondo tumore maligno nella donna, con circa 500.000 nuovi casi per anno, dei quali l'80% nei Paesi in via di sviluppo, e 274.000 decessi.
- L'incidenza e la mortalità del cancro cervicale varia a seconda dell'età, raggiungendo un picco nelle donne di 40 anni di età.
- L'introduzione di programmi organizzati di screening basati sul PAP TEST ha determinato, nei paesi industrializzati, un'importante riduzione dell'incidenza di questa patologia.

SITUAZIONE IN ITALIA:

AIRTUM *1998-2002*

(Dati raccolti nell'area dell'Associazione Italiana Registri Tumori)

Sesso	*Incidenza (1)*	*Mortalità (2)*
Femmine	*1,6 %*	*0,6 %*

(1) Incidenza % sul totale dei tumori diagnosticati
(2)Mortalità % sul totale dei decessi tumorali (da aggiungere quota da decessi "utero non specificato" = 2,6%)

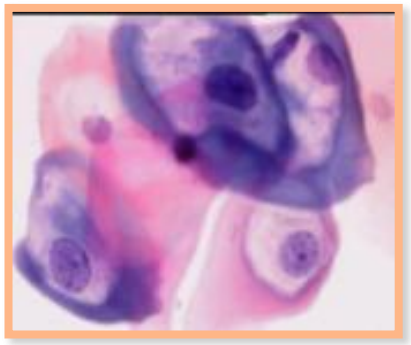
www.registri-tumori.it/

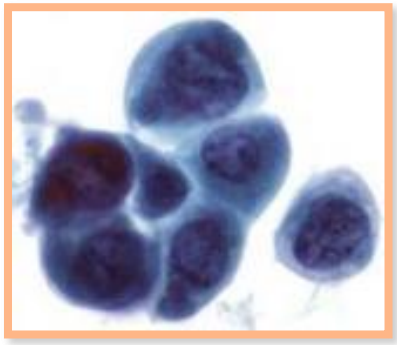
PATOGENESI DEL CANCRO CERVICALE

~ 1 anno

Infezione transitoria

Infezione da HPV





Infezione persistente ⇔ Displasia di basso grado ⇔ Displasia di alto grado

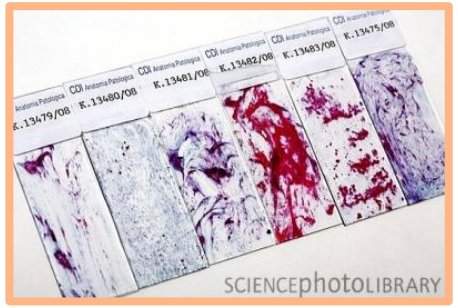
Oltre 1-2 anni — 4-5 anni — 9-12 anni

Cancro invasivo

Il cancro della cervice si sviluppa dopo molto tempo dall'infezione iniziale attraverso una fase pre-cancerosa.

Lo screening della cervice in Abruzzo

- PAP TEST convenzionale: test di screening primario (1999-2009) condizionato da un alto livello di soggettività e ambiguità di un test basato sull'interpretazione morfologica.



- PAP TEST in fase liquida ThinPrep su strato sottile ad oggi il metodo più sensibile per individuare lesioni cellulari in fase precoce.
(*STUDIO ARINT 2006-2009*)

- HR-HPV TEST: test di screening primario (dal 1 Gennaio 2010) caratterizzato da un'elevata sensibilità a discapito della specificità.

MARCATORI DI PROGRESSIONE: P16

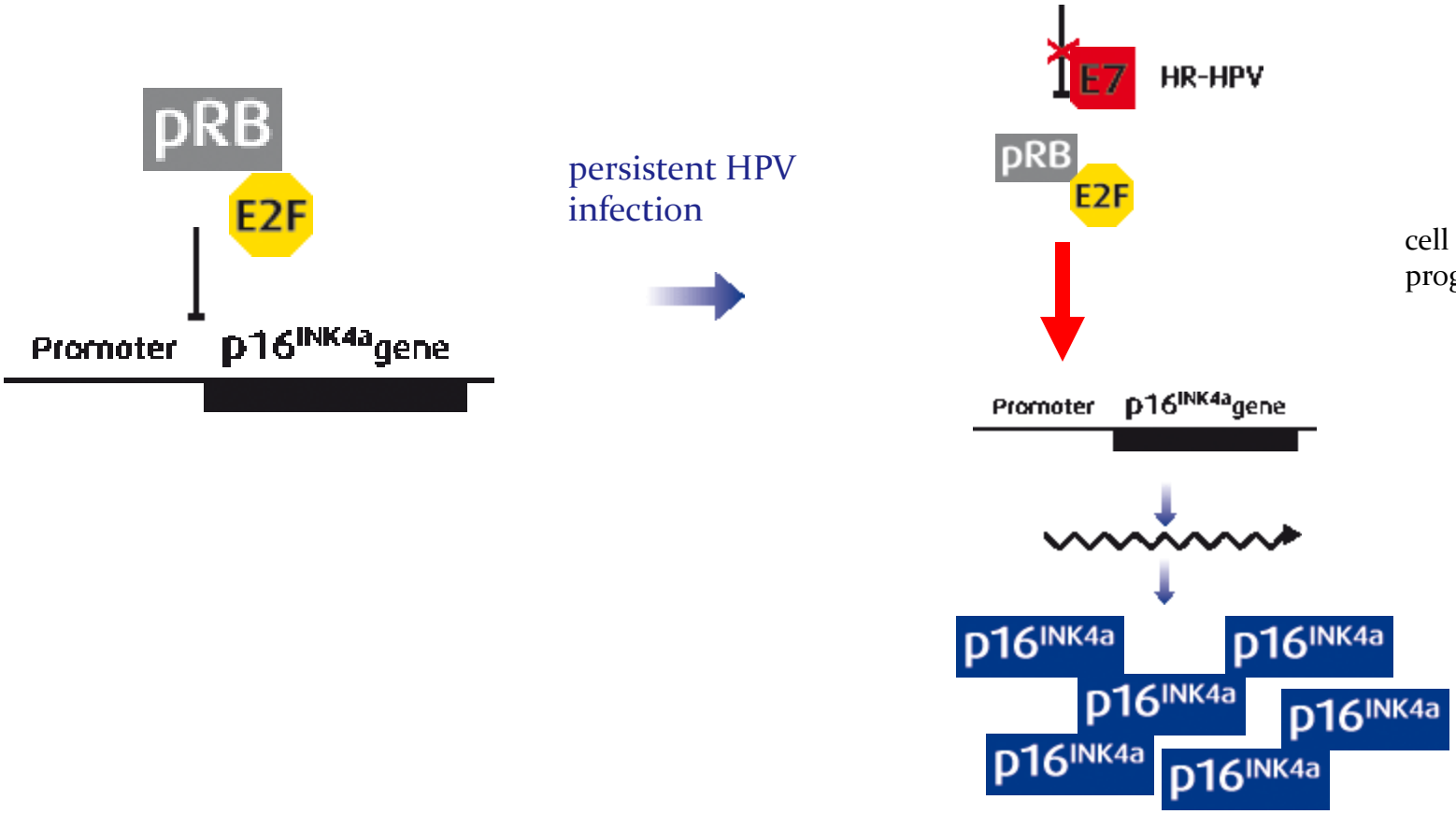
- La proteina p16 è un inibitore delle chinasi ciclina dipendenti ed è il prodotto di un gene oncosoppressore il quale prevenendo la fosforilazione della pRb impedisce la progressione del ciclo cellulare.

- L' iperespressione della proteina p16 evidenzia l'inattivazione del controllo del ciclo cellulare mediato dalle oncoproteine dell' HR-HPV ovvero il principale processo patologico nel cancro cervicale.

- Indipendente dal tipo di HR-HPV.

- Indipendente dall' età della paziente.

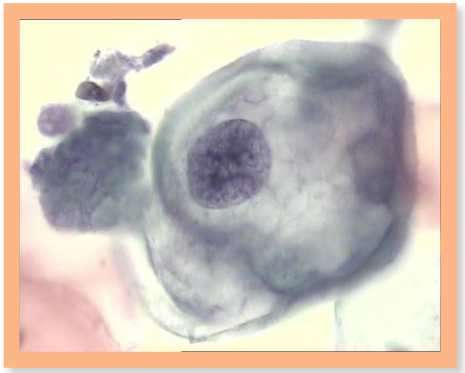
MECCANISMO MOLECOLARE P16INK4A

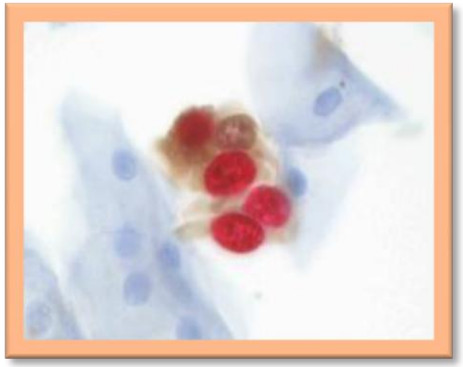


MTMLABS

P16INK4A

L' iperespressione della proteina p16 evidenzia l'inattivazione del controllo del ciclo cellulare mediato dalle oncoproteine dell' HR-HPV ovvero il principale processo patologico nel cancro cervicale.





Nel Pap test questo test facilita l'identificazione delle cellule anormali aumentando l'accuratezza diagnostica.

Se **Positivo** :

- Rischio oncogeno
- Oncogenesi in atto
- Trattamento

Ki 67

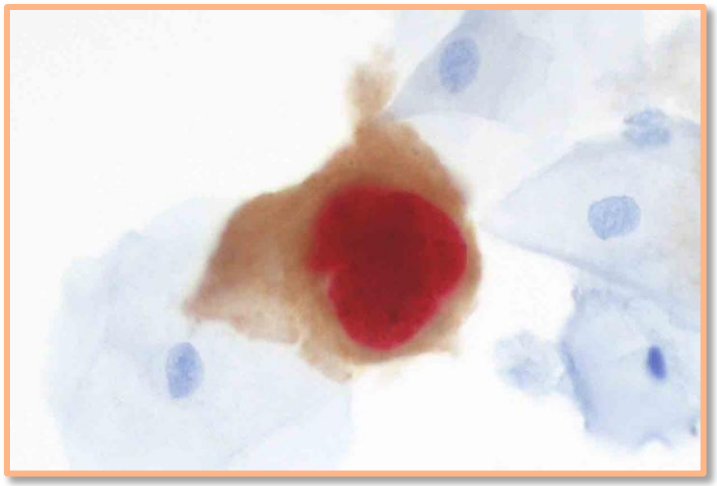
- Proteina espressa a livello nucleare in cellule in attiva proliferazione e viene impiegata quindi per valutare proprio il grado di proliferazione cellulare;

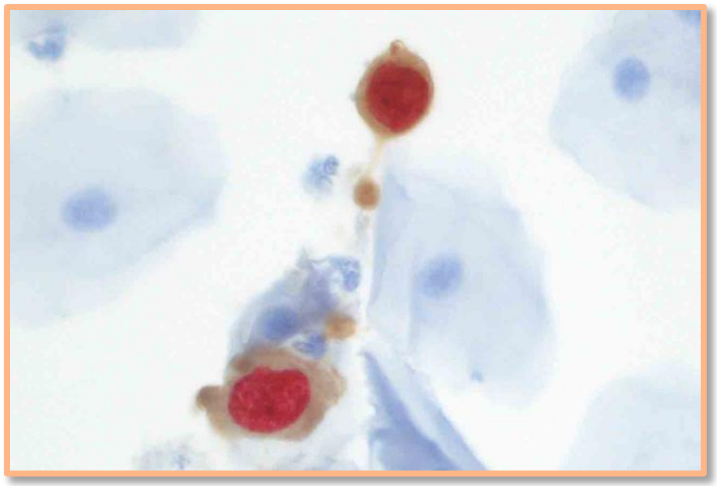
- La co-presenza immunoistochimica della **p16** e del **Ki67**, indica zone ad alto indice di proliferazione e può quindi far presupporre la presenza di alterazioni epiteliali indotte dal meccanismo oncogenetico dell'HPV e di conseguenza risulta di grande aiuto nella diagnosi e nel stabilire il grado delle lesioni proliferative cervicali.

La determinazione della p16, del Ki67 e la tipizzazione dell' HPV rappresentano dunque un ottimo supporto diagnostico.

CINTEC PLUS (P16INK4A DUAL TEST)

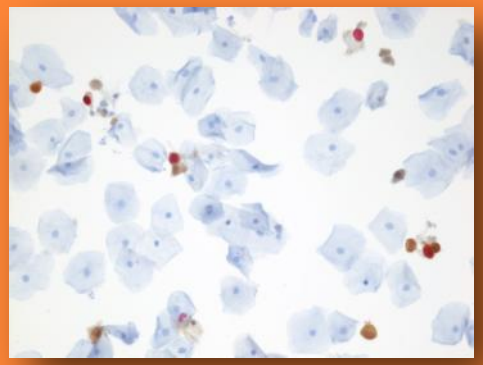
- Combinazione di due colorazioni (p16 e Ki67) in un unico test.
- Può essere applicato sia alla citologia convenzionale che alla citologia in fase liquida.
- Le cellule positive mostrano la colorazione per entrambe le proteine (citoplasma marrone per l'iperespressione di p16, nucleo rosso per Ki67).



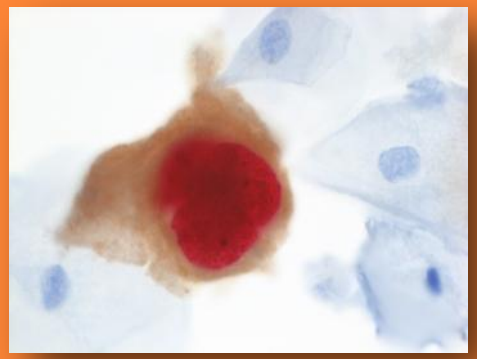


Interpretazione di p16/Ki-67 (doppia colorazione)

Funzione Localizzatrice



Interpretazione



Screening per p16/Ki-67
Doppia Colorazione Cellulare

Presenza di una o più cellule doppiamente colorate?

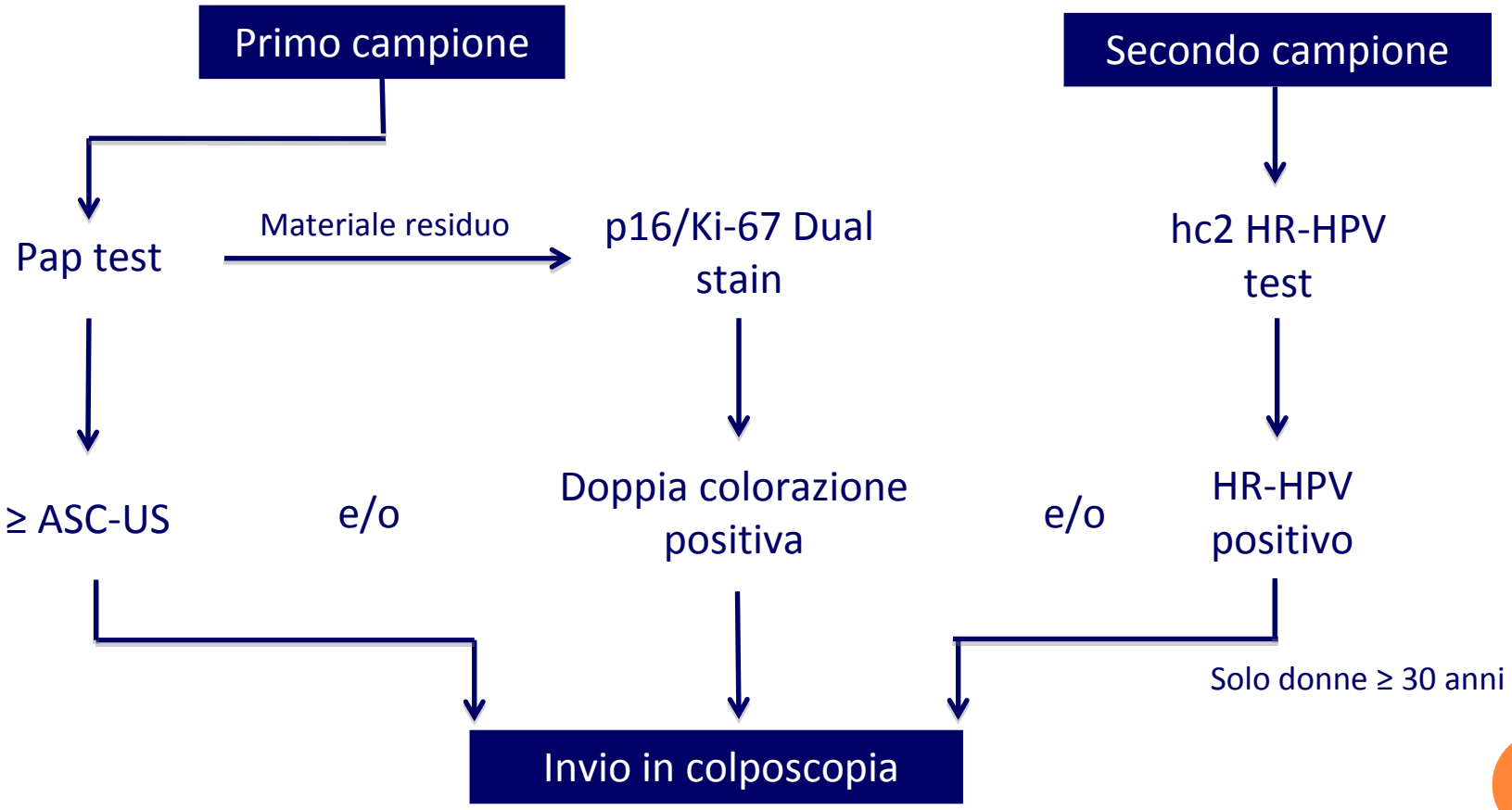
SI → CINtec® *PLUS* *Positivo*

NO → CINtec® *PLUS* *Negativo*

Primary, ASC-US, LSIL Marker Study (PALMS)

- Valutazione delle caratteristiche di performance del CinTec *plus* in donne arruolate nello screening citologico di routine.
- Valutazione in un setting di triage per *ASC-US* e *LSIL*.

Primary, ASC-US, LSIL Marker Study (PALMS)

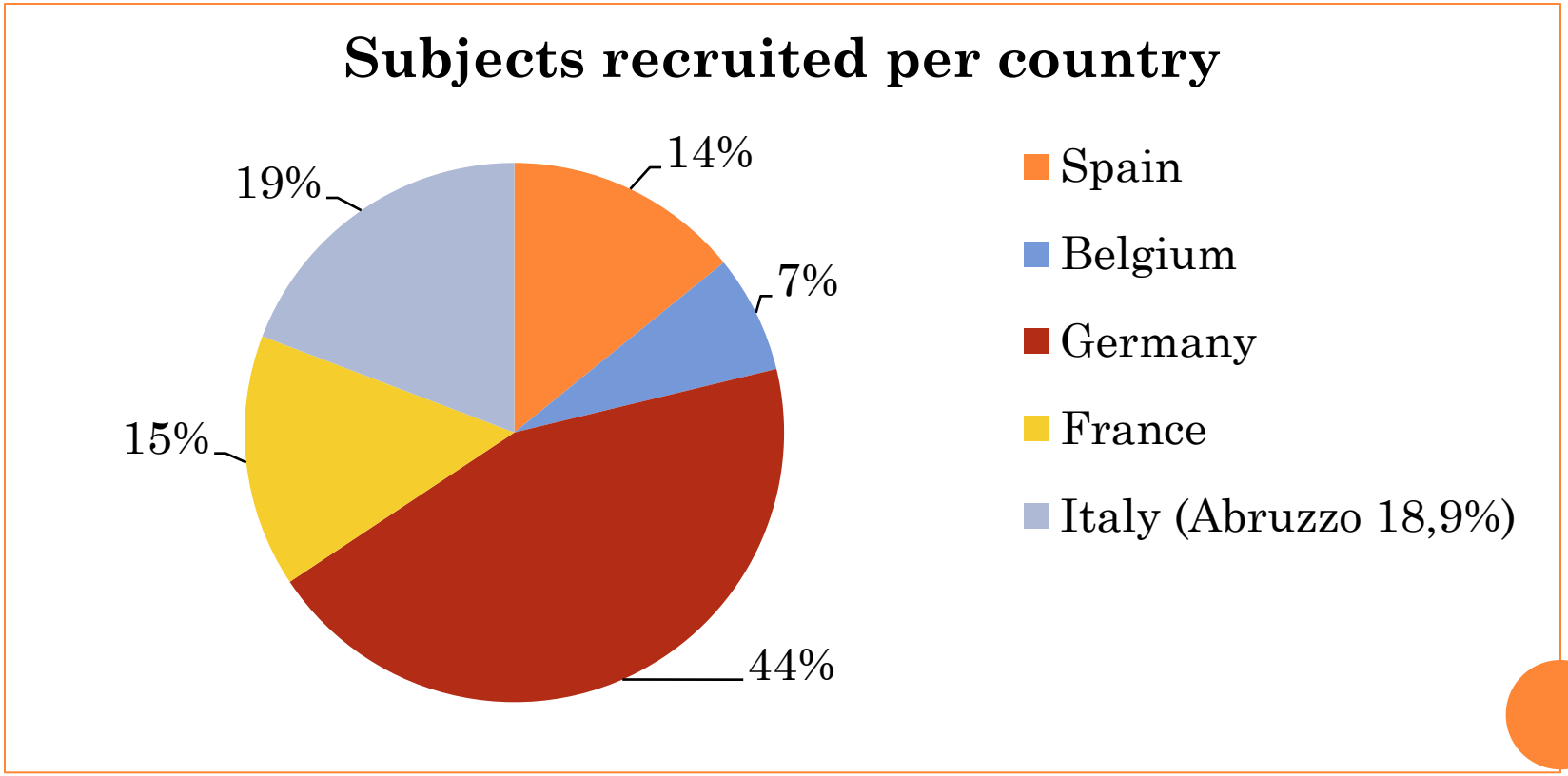


Primary, ASC-US, LSIL Marker Study (PALMS)

- Pap test (CC & LBC), CinTec *plus* , e HC2 HR HPV test eseguiti su tutte le donne
- *LBC: ThinPrep® (Hologic), Surepath® (BD Tripath)*
- Se uno o più test risultava positivo le donne venivano inviate a colposcopia e se indicata venivano sottoposte a biopsia.
- L'istologia rappreantava il Gold standard delle diagnosi.

Primary, ASC-US, LSIL Marker Study (PALMS)

- Uno studio multinazionale, multicentrico, prospettico e diagnostico su una coorte di *27˙000* donne.



– Risultati del Trial PALMS –

Gestione delle donne Pap- / HPV+ con p16/Ki-67 Dual-stained Cytology

Sub-analisi 1023 Partecipanti al PALMS

p16/Ki-67 Dual-stained Cytology using ThinPrep® cytology

Sub-analisi >9000 Partecipanti al PALMS

– Risultati del Trial PALMS –

Gestione delle donne Pap- / HPV+ con p16/Ki-67 Dual-stained Cytology

Sub-analisi 1023 Partecipanti al PALMS

PAP / HPV Co-Testing nello screening Cervicale

- L'abbinamneto dei test è più sensibile per il rilevamento delle lesioni CIN2+ rispetto al solo Pap test.
- E' indicato solo per le donne di età > 30-35 anni.
- Si identifica una nuova categoria di screening: Donne Pap - / HPV + (4-6% delle donne osservate con più di 30 anni).
- Gli attuali protocolli raccomandano la ripetizione del test dopo 12 mesi.

Gestione dei risultati del co-testing Pap/HPV

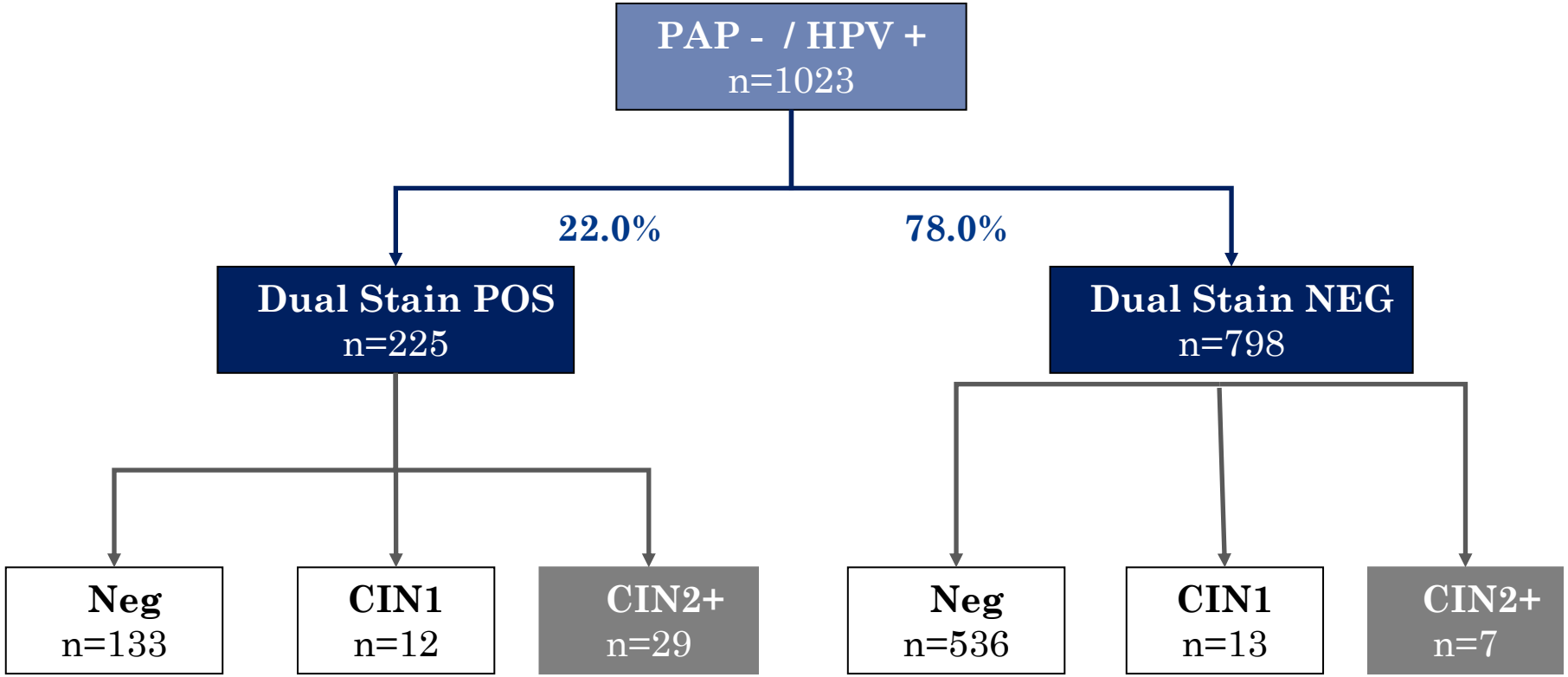
- Cosa fare con i risultati Pap negativi, HPV positivi?
  - Da questo gruppo si recuperano ulteriori casi di malattia
- Necessità per un efficiente test di triage
  - Limitare l'alta sensibilità del test HPV per trovare le CIN2+
  - Trovare una gestione alternativa all'invio diretto in colposcopia (risorse limitate) oppure alla ripetizione del test (tempi più lunghi)

p16/Ki-67 Triage of Pap neg, HPV pos – PALMS Study Data –

- Sono state analizzati i risultati di 1023 donne partecipanti al PALMS
  - Età > 30 anni
  - Pap test - / HPV test +
  - Rappresentano il 5.3% (1023/19205)
  - Istologicamente confermate CIN2+

p16/Ki-67 Triage of Pap neg, HPV pos

– PALMS Study Data –



Mancate colposcopie: n=51

Mancate colposcopie: n=242

p16/Ki-67 Triage of Pap neg, HPV pos: Sensibilità e Specificità

	CIN2+		CIN3+	
	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)
Sensibiità	29/36	**80.6%** (64.0-91.8%)	16/20	**80.0%** (56.3-94.3%)
Specificità	549/694	**79.1%** (75.9-82.1%)	552/710	**77.7%** (74.5-80.6%)

- Sensibilità di p16/Ki-67 Dual stain per CIN2+ (CIN3+) dell' 80.6% (80.0%) per donne di età ≥30; alta specificità
- Trovata la maggioranza delle malattie immediatamente in solo il 22% dei casi Pap neg, HPV pos che sono positivi al p16/Ki-67 Dual stain

Conclusioni

p16/Ki-67 Triage Pap neg / HPV pos

- Alta sensibilità e specificità di p16/Ki-67 Dual stain (CINtec® PLUS) per identificare quelle donne all'interno del gruppo Pap neg, HPV pos che molto probabilmente presentano lesioni CIN2+.
- Il 22% delle donne è stato inviato a colposcopia beneficiando di un immediato follow-up.
- Potenziale indicazione di triage nelle donne HPV + e Dual stain + nello screening con HPV primario per donne di tutte le età.
- Potenziale identificazione della maggior parte dei casi con malattia esistente evitando ritardi diagnostici.

Conclusioni

p16/Ki-67 Triage Pap neg / HPV pos

- Risultati Negativi di p16/Ki-67 escludono le CIN2+ nel sottogruppo di donne Pap - / HPV + con alto VPN (98.7%)

- Confermando i risultati di alta sensibilità e specificità dello studio retrospettivo di Wolfsburg.
  (Petry et al. Gynecol Oncol. 2011; 121(3):505-9)

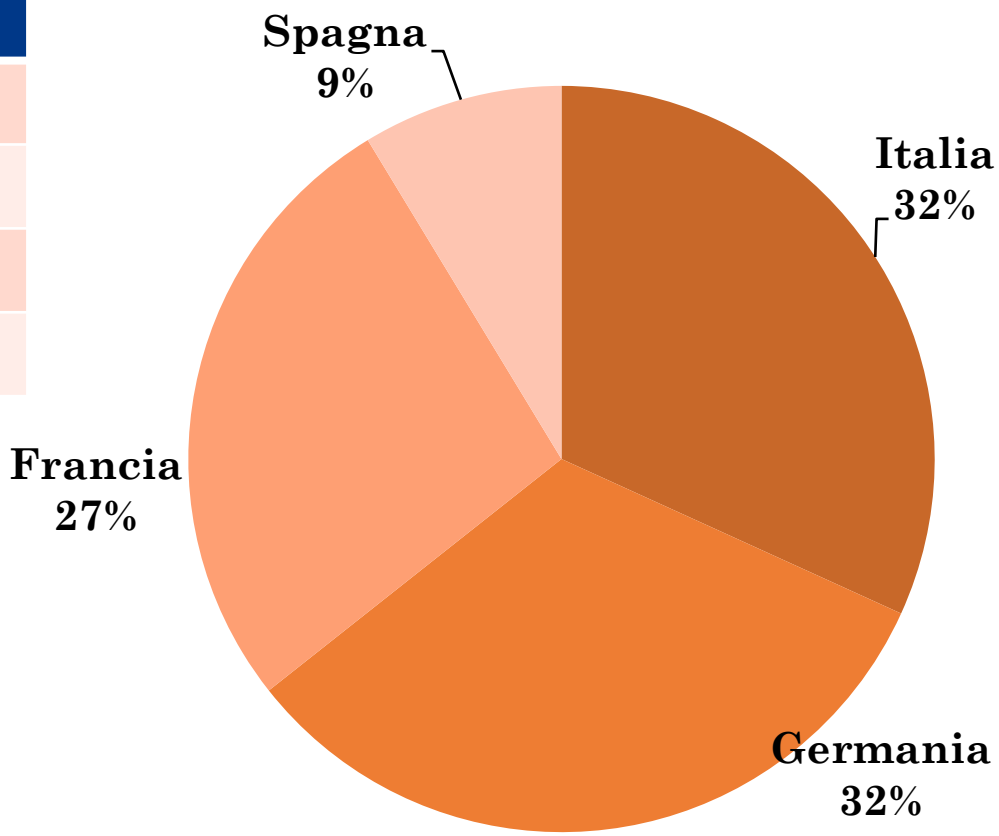
– Risultati del Trial PALMS –

p16/Ki-67 Dual-stained Cytology using ThinPrep® cytology

Sub-analisi > 9000 Partecipanti al PALMS

Sottogruppo PALMS con citologia in fase liquida ThinPrep®

Nazione	ThinPrep LBC
Germania	3,005
Italia	2,935
Francia	2,489
Spagna	802



Tassi di positività ai test

	PapTest (ASC-US+)		p16/Ki67 Dual stain		HPV test	
	n	%	n	%	n	%
Tutte le età (n=9231)	521	**5.6%**	528	**5.7%**	1,033	**11.2%**
<30 *(n=2055)*	195	**9.5%**	215	**10.5%**	442	**21.5%**
≥30 (n=7176)	326	**4.5%**	313	**4.4%**	591	**8.2%**

Sensibilità e Specificità vs Citologia

- Pap test vs p16/Ki-67.
- Donne di tutte le età (18-65 anni).
- N°67 CIN2+ confermati.

	Sensibilità		Specificà	
	%	95% CI	%	95% CI
p16/Ki-67 Dual stain	**95.6%**	87.1 – 98.6%	**95.0%**	94.4 – 95.4%
Pap cytology (ASC-US+)	**80.2%**	68.5 – 88.3%	**95.1%**	94.6 – 95.6%

Sensibilità e Specificità ThinPrep® Pap test vs. p16/Ki-67 e HPV test, per gruppi di età

	p16/Ki-67 Dual stain		Pap Cytology (ASC-US+)		HPV test	
	Sens	Spec	Sens	Spec	Sens	Spec
Tutte le età	**95.6%**	95.0%	**80.2%**	95.1%	N/A	N/A
<30	**100%**	91.2%	**81.6%**	92.2%	N/A	N/A
≥30	**91.2%**	96.0%	**77.9%**	95.9%	**96.1%**	92.1%

Sensibilità e specificità
ThinPrep vs Altri Pap

- Donne di tutte le età (18-65).

	p16/Ki-67 Dual stain		Pap Cytology (ASC-US+)	
	Sensibilità	Specificità	Sensibilità	Specificità
ThinPrep	95.6%	95.0%	80.2%	95.1%
Tutti i metodi Pap	90.1%	95.3%	66.4%	95.4%

Triage delle ASC-US
Risultati nel sottogruppo ThinPrep®

N°190 casi ASC-US

	Tasso di positività al Test	Sensibilità		Specificità
	%	CIN2+	% (95% CI)	% (95% CI)
p16/Ki-67 Dual stain	**33.2%**	**13/13**	**100%** (75.3-100%)	**73.5%** (66.1-79.8%)
HPV test	**51.6%**	**13/13**	**100%** (75.3-100%)	**53.3%** (45.7-60.7%)

p16/Ki-67 ha mostrato la stessa sensibilità, ma una specificità significativamente maggiore rispetto al test HPV per l'identificazione delle donne CIN2+.

Triage delle LSIL
Risultati nel sottogruppo ThinPrep®

N° 223 casi LSIL

	Tasso di positività al test	Sensibilità		Specificità
	%	CIN2+ Casi	% (95% CI)	% (95% CI)
p16/Ki-67 Dual stain	**46.6%**	**18/19**	**94.5%** (69.6-99.2%)	**59.4%** (52.3-66.2%)
HPV test	**79.4%**	**19/19**	**100%** (82.4-100%)	**23.3%** (17.9-29.7%)

p16/Ki-67 ha mostrato una sensibilità del 94.7% (vs. 100% per HPV), con una specificità del 59.4% (vs. 23.3% per HPV).

Conclusioni
sottogruppo PALMS ThinPrep®

- p16/Ki-67 eseguita su ThinPrep® in donne in screening può raggiungere una sensibilità del 95% e una specificità del 95%
  - Sensibilità significativamente più alta della Citologia con stessa specificità
  - Sensibilità simile a quella del test HPV; Specificità significativamente più elevata (screening e triage di ASC-US / LSIL)
- La diagnostica con p16/Ki-67 può essere ulteriormente migliorata in relazione ai metodi usati nella Citologia.

PALMS Study Group

Major Clinical Contributors:

Claudio Angeloni, Hans Ikenberg, Dietmar Schmidt, Henrik Griesser, Francisco Alameda,, Christine Bergeron, Johannes Bogers, Roger Dachez, Karin Denton, Jalil Hariri, Thomas Keller, Magnus von Knebel Doeberitz, Heinrich H. Neumann, Luis M. Puig-Tintore, Mario Sideri, Sigrid Regauer, Annie Vereecken, Christophe Depuydt, Ina Benoy, Shaira Sahebali, Olivier Aynaud; Jean-Jacques Baldauf, Jean-Marc Bohbot, Christine Dépardon, Bernard Huynh, Philippe Judlin, Gerlinde Lang-Avérous, Béatrice Marie, Guiseppe Pollini, Olaf Bettendorf, Christoph Börsch, Friederike Brinkmann-Smetanay, Christine Buhrmann, Anita Eich, Stephan Falk, Manfred Johnscher, Bodo Jordan, Frieder Kommoss, Volkmar Küppers, Marcel Marquardt, Yvonne Mikulec, H.J. Pablo Roth, James Seabert, Torsten Schmidt, Martin Tenger, Marcus J. Trunk, Ulrich Zahn, Amedeo Lattanzi, Antonio Angelone, Domenico Angelucci, Donatella Caraceni, Chiara Casadio, Lucia Ciccocioppo, Gino Coletti, Ada D'Amario, Gilda Di Paolo, Camillo Di Giulio, Carmine Fortunato, Vincenzo Maccallini, Carla Peluzzi, Massimo Pensieri, Maria Antonella Piccirilli, Giuseppe Pizzicannella, Bruna Ponte, Tatiana Reggi, Sandra Rosini, Solidea Saltarelli, Enrico Scala, Rosella Stampone, Vera Stornelli, Alfonso Tiberi, Maria Antonietta Venditti, Maria Ventura, Rosa Almirall, Ignacio Aranda, Victoria Batolome, Montse Cardona, Pluvio Coronado, Marta Del Pino, Vicente Furió Bacete, Pere Fuste, Mireya Jimeno, Belén Lloveras Rubio, José Antonio López Garcia-Asenjo, Gemma Mancebo, Juan Carlos Martinez Escoriza, Roser Nonell, Jaume Majà Ordi, Francisco Javier Segui Ivànez, Aureli Torné Blade, Jose Antonio Vidart Arragon ….

… and many others!