

**Webinar GISCI, 19 novembre 2020**  
**“Focus sui biomarcatori:**  
**stato della ricerca, approfondimenti e prospettive per la possibile introduzione nei protocolli di screening”**

**CHAT : Domande poste in chat dai partecipanti, risposte dei relatori, opinioni dei discussant e dei partecipanti**

	<b>Autore</b>	<b>Domanda</b>	<b>Relatore Discussant Partecipante</b>	<b>Risposta Opinioni</b>
1	Canuti Debora <i>Rimini</i>	Quale aspetto andrebbe sistematicamente più documentato in letteratura per poter indirizzare adeguatamente all'utilizzo di un biomarcatore?	Venturelli Francesco <i>Reggio Emilia</i>	Per poter implementare i biomarcatori come triage negli attuali protocolli di screening, sarebbe opportuno sistematizzare le evidenze già disponibili su incidenza cumulativa a lungo termine in donne HPV+/biomarker negative. Sarebbe inoltre opportuno riportare in maniera più sistematica il ruolo prognostico dei biomarcatori rispetto alla clearance delle infezioni HPV e alla regressività delle lesioni. Tali evidenze permetterebbero di valutare l'impatto dell'allungamento dell'intervallo per ripetizione del test HPV in donne triage negative, in termini di sicurezza e di efficienza del protocollo complessivo.
2	Burroni Elena <i>Firenze</i>	Sarebbe auspicabile l'introduzione nello screening di sistemi che prevedano la genotipizzazione di tutti i ceppi hr-HPV?	Carozzi Francesca <i>Firenze</i>	I dati mostrati sembrano interessanti sia per screening primario che per follow-up e triage delle ASC-US, ma per farlo occorre modificare i protocolli nazionali e le linee guida.
3	Genovese Francesco <i>Palermo</i>	In attesa di una ufficiale raccomandazione all'utilizzo della genotipizzazione, come possiamo attualmente utilizzare la genotipizzazione per alleggerire l'invio in colposcopia delle donne?	Carozzi Francesca <i>Firenze</i>	Occorre attendere che vengano modificati i protocolli e le linee guida. In ogni caso non è detto che l'utilizzo della genotipizzazione totale o parziale porti a diminuzione del carico colposcopico ma dovrebbe consentire una migliore stratificazione del rischio e quindi una maggiore personalizzazione.

## Webinar GISCi, 19 novembre 2020

### “Focus sui biomarcatori: stato della ricerca, approfondimenti e prospettive per la possibile introduzione nei protocolli di screening”

#### CHAT : Domande poste in chat dai partecipanti, risposte dei relatori, opinioni dei discussant e dei partecipanti

4	Schettino M.Teresa <i>Napoli</i>	Il microbiota vaginale potrebbe avere un ruolo come biomarcatore? A che punto è la ricerca?	Carozzi Francesca <i>Firenze</i>	La ricerca in questo settore è molto promettente. Ci sono alcuni studi (es: <i>Di Paola et al 2017</i> , condotto su campioni di screening con HPV) che mettono in correlazione le alterazioni del microbiota con una maggiore o minore persistenza dell'infezione. <i>Gardnerella vaginalis</i> e <i>Atopobium vaginalis</i> producono un biofilm che potrebbe contribuire alla persistenza virale e potrebbero essere proposti come biomarcatori. Se questi dati venissero confermati si aprirebbero scenari per sviluppare agenti terapeutici per promuovere la clearance di HPV in donne con infezione e ridurre il rischio di lesioni intraepiteliali. Le metodiche di rilevazione sono comunque al momento molto complesse e non consentono una applicazione routinaria.
5	Gillio Tos Anna <i>Torino</i>	E' stato ipotizzato l'utilizzo della genotipizzazione in combinazione con altri biomarcatori e quali?	Carozzi Francesca <i>Firenze</i>  Del Mistro Annarosa <i>Padova</i>	Sicuramente i risultati migliori sia per il triage che per il follow-up prevedono l'uso combinato e sequenziale di più marcatori: genotipizzazione, p16/ki67, citologia. L'inserimento della genotipizzazione parziale o completa nello screening e nel FU è, nei vari protocolli, associata alla citologia che è fondamentale per guidare gli intervalli di richiamo nel Follow-up. Il risultato della genotipizzazione non viene da un esame aggiuntivo ma può far parte del risultato del test HPV di screening. Lavori interessanti a riguardo: <i>Arbyn et al, Ann Intern Med 2017; Stanczuk et al, CEBP 2017; Cuzick et al, Can Epidemiol 2020</i> .  La genotipizzazione (parziale HPV16/18, allargata ad altri tipi quali HPV33, HPV35, HPV31, o completa di tutti i tipi ad alto rischio) utilizzata da sola come triage ha dei limiti sia di sensibilità che di specificità, che possono essere bilanciati da un uso che la preveda in combinazione con altri biomarcatori. In particolare, i risultati del trial clinico randomizzato NTCC condotto in Italia, indicano che la genotipizzazione (parziale o allargata) potrebbe essere combinata con la citologia o con la p16.

## Webinar GISCI, 19 novembre 2020

### “Focus sui biomarcatori: stato della ricerca, approfondimenti e prospettive per la possibile introduzione nei protocolli di screening”

#### CHAT : Domande poste in chat dai partecipanti, risposte dei relatori, opinioni dei discussant e dei partecipanti

6	Gillio Tos Anna <i>Torino</i>	HPV18 ha una frequenza bassa nella popolazione, eppure viene inserito nella maggior parte dei test che offrono tipizzazione parziale. Qual è il peso del rischio legato ad HPV18?	Del Mistro Annarosa <i>Padova</i>	HPV18 ha una bassa associazione con le lesioni pre-neoplastiche, ma una maggiore associazione con il carcinoma, soprattutto l'adenocarcinoma (difficile da prevenire con lo screening citologico). Inoltre, le lesioni da HPV18 sono spesso endocervicali, e quindi più difficili da rilevare con la colposcopia. Per questi motivi, le infezioni da HPV18 devono essere monitorate.
7	Galliano Tinacci <i>Pescia, PT</i>	Qual è il peso della soggettività nell'interpretazione dell'analisi immunocitochimica p16/ki67? Esistono analisi di riproducibilità?	Maria Benevolo <i>Roma</i>  Bellomi Alberto <i>Mantova</i>	Pur se esistono criteri di valutazione e cut-off per la positività ben definiti e più chiari rispetto alla sola colorazione con p16, la valutazione della doppia colorazione è una valutazione al microscopio ottico e quindi operatore dipendente, elemento che implica sempre un certo grado di variabilità. Sono stati pubblicati diversi lavori che hanno affrontato il tema della riproducibilità di interpretazione. L'unico studio che ha valutato la riproducibilità su un'ampia popolazione di screening è stato NTCC2 e i risultati sono stati pubblicati recentemente ( <i>Benevolo et al, Cancer Cytopathol 2020</i> ). Sono inoltre attualmente in studio sistemi di lettura automatica che potrebbero diminuire la soggettività.  Il problema dell'utilizzo dell'immunocitochimica in citologia cervicale è storicamente penalizzato dall'esistenza di centri di citologia al di fuori dell'anatomia patologica
8	Galliano Tinacci <i>Pescia, PT</i>	Sono in preparazione analisi molecolari per sostituire l'attuale indagine immunocitochimica p16/ki67?	Maria Benevolo <i>Roma</i>	Non per la ricerca di p16. Attualmente allo studio come test molecolari per il triage della positività di HR-HPV ci sono il test per mRNA degli oncogeni E6 ed E7 di HPV, la metilazione di geni virali e/o cellulari e la genotipizzazione 16/18 o estesa ad altri genotipi.

**Webinar GISCI, 19 novembre 2020**

**“Focus sui biomarcatori:**

**stato della ricerca, approfondimenti e prospettive per la possibile introduzione nei protocolli di screening”**

**CHAT : Domande poste in chat dai partecipanti, risposte dei relatori, opinioni dei discussant e dei partecipanti**

9	Galliano Tinacci <i>Pescia, PT</i>	L'analisi p16/ki67 è estensibile a livello istologico?	Maria Benevolo <i>Roma</i>  Giorgi Rossi Paolo <i>Reggio Emilia</i>	<p>Il kit per la doppia colorazione p16/ki67 è validato per uso su campioni citologici. Può essere applicato anche su reperti istologici ma senza validazione per ora. In istologia è attualmente la colorazione per la sola proteina p16 come ausilio diagnostico. Per utilizzarla come marcatore prognostico andrebbe utilizzata su biopsie negative o CIN1 di donne HPV positive, per determinarne la probabilità di progressione</p> <p>La p16 in istologia, se usata per valutare la prognosi della lesione non trattata (mettiamo una CIN1 su cui si è fatta la immuno-istochimica per p16 per risolvere il dubbio che sia CIN1 o CIN2), ha un simile valore prognostico, ma ci sono due punti che rendono le cose un po' più complicate: 1) La biopsia è un campionamento ancora meno sensibile della citologia, dunque se non è biopsiato nel punto corretto il valore della p16 istologica è limitata (questo si vede pure con la citologia H-SIL, che predice molto bene la presenza di lesioni anche dopo una colpo o una biopsia negativa); 2) la positività a p16 in istologia spesso determina la diagnosi (si fa per ausilio diagnostico), dunque il suo valore prognostico diventa un po' tautologico.</p>
10	Burroni Elena <i>Firenze</i>	Il test HPV-mRNA è già adeguato a sostenere i volumi di attività dello screening in termini di grado di automazione, efficienza dei tempi di esecuzione, etc?	Bisanzi Simonetta <i>Firenze</i>	Lo studio NTCC2 ha valutato anche la fattibilità del test HPV-mRNA nel contesto dello screening organizzato. Il test è risultato fattibile su larga scala con il sistema automatizzato in uso nello studio. E' eseguito sullo stesso campione usato per la citologia; la quantità di campione necessaria è esigua, e si possono eseguire più ripetizioni sullo stesso campione. Le modalità di conservazione del campione permettono la dilazione dell'analisi.

**Webinar GISCi, 19 novembre 2020**

**“Focus sui biomarcatori:**

**stato della ricerca, approfondimenti e prospettive per la possibile introduzione nei protocolli di screening”**

**CHAT : Domande poste in chat dai partecipanti, risposte dei relatori, opinioni dei discussant e dei partecipanti**

11	Burroni Elena <i>Firenze</i>	Qualche paese adotta il test HPV-mRNA nei programmi di screening organizzato?		Nel Regno Unito, dove non sono seguite le linee guida europee, sono usati nei programmi di screening sia il test a DNA che il test a mRNA. La Scozia dovrebbe aver iniziato nel 2020 lo screening cervicale con il test HPV-mRNA.
12	Pompeo Giampaolo <i>Firenze</i>	Il test utilizzato in NTCC2 per individuare l'HPV-mRNA prevede anche una genotipizzazione del tipo di HPV coinvolto?	Bisanzi Simonetta <i>Firenze</i>	Il test HPV-mRNA utilizzato nello studio NTCC2 determina la presenza dell'mRNA dei tipi HPV ad alto rischio, senza distinguere il tipo di HPV.
13	Garutti Paola <i>Ferrara</i>	Tra le varie applicazioni cliniche, quale potrebbe essere la prima in cui introdurre i test di metilazione, qualora siano disponibili test in linea con i requisiti che hai enunciato?	Gillio Tos Anna <i>Torino</i>  Ronco Guglielmo <i>Torino</i>	Premetto che per le analisi di metilazione è ancora necessario dimostrare con analisi sistematiche la solidità dei risultati degli studi. A seguito, sfruttando la condizione di negatività alla iper-metilazione, quindi il VPN, si potrebbe farne uso nel 1° livello di screening, per meglio selezionare l'invio in colpo delle donne HPV positive o delle donne con persistenza alla ripetizione dopo 12 mesi. Sempre nel 1° livello di screening, potrebbe essere utile utilizzare i test di metilazione in caso di autoprelievo, non potendo con questo sistema usufruire del supporto della citologia di triage.  Sarei per ora cauto sulla metilazione. La mia diapositiva del 2017 mostra che, considerando i prelievi fatti al baseline, la percentuale di donne che hanno ipermetilazione è nettamente più alta tra chi avrà una CIN3 trovata >1-3 aa dopo che in quelle che hanno avuto la CIN3 trovata entro un anno. Tuttavia, se si confronta il valore in un prelievo dopo il baseline ma non dopo la diagnosi di CIN3 non è così

## Webinar GISCi, 19 novembre 2020

### “Focus sui biomarcatori: stato della ricerca, approfondimenti e prospettive per la possibile introduzione nei protocolli di screening”

#### CHAT : Domande poste in chat dai partecipanti, risposte dei relatori, opinioni dei discussant e dei partecipanti

14	Passamonti B. Ubaldo <i>Perugia</i>	L'endpoint negli studi di metilazione è spesso CIN3 e non CIN2+. Si deve pensare che in futuro il cut off di diagnosi di lesione pre-neoplastica di alto grado venga alzato a CIN3?	Gillio Tos Anna <i>Torino</i>  Giorgi Rossi Paolo <i>Reggio Emilia</i>	<p>Questa domanda richiede un più autorevole parere di clinici ed epidemiologici. Come biologo, mi sento però di dire che nella valutazione dell'efficacia di un biomarcatore convenga tenere come endpoint la CIN3, che meglio definisce lo stato di precancerosi cellulare. L'obiettivo infatti, anche per questo biomarcatore, è di individuare nel campione analizzato il “germe di CIN3”, che è associato al rischio di progressione.</p> <p>Non credo ci si orienti sull'innalzamento del cut off a CIN3. L'efficacia dello screening nel prevenire il Ca invasivo dipende sicuramente anche dal trattamento delle CIN2. La scelta del CIN3 come outcome degli studi dipende da due fattori. 1) la diagnosi di CIN3 è molto più riproducibile; 2) l'incidenza di CIN3 rispecchia molto più fedelmente il rischio di cancro invasivo negli anni successivi, anche se non è esente da problemi. Quello che probabilmente succederà nel futuro rispetto al trattamento delle CIN2 sarà una maggiore capacità di distinguere le CIN2 ad alta probabilità di regressione che possono non essere trattate subito. Ma questo non esclude il trattamento delle CIN2 in futuro.</p>
15	Pompeo Giampaolo <i>Firenze</i>	Potrebbe emergere un ruolo importante della metilazione nel follow-up delle donne HPV positive, citologia positiva ma CIN2+ negative?	Gillio Tos Anna <i>Torino</i>	<p>Sì, se le analisi sistematiche avvaloreranno l'efficacia della metilazione come biomarcatore. In particolare, lo stato di negatività alla iper-metilazione potrebbe essere impiegato per evitare di sottoporre a controlli frequenti donne che non ne hanno necessità in quanto a rischio limitato di progressione.</p>
16	Pompeo Giampaolo <i>Firenze</i>	Per i test di metilazione, c'è ancora scarso livello di automazione?	Gillio Tos Anna <i>Torino</i>	<p>La trasposizione in ambito clinico dei test di metilazione è ancora in fase di studio e di validazione, pertanto l'automazione dei processi analitici è scarsa. E infatti, il numero di test commerciali per i test di metilazione è ancora molto esiguo. L'automazione è disponibile per i processi che prevedono analisi in scala genomica, ma con costi a oggi non sostenibili in ambito clinico.</p>

## Webinar GISCi, 19 novembre 2020

### “Focus sui biomarcatori:

### stato della ricerca, approfondimenti e prospettive per la possibile introduzione nei protocolli di screening”

#### CHAT : Domande poste in chat dai partecipanti, risposte dei relatori, opinioni dei discussant e dei partecipanti

17	Gillio Tos Anna Torino	Le evidenze si orientano verso la possibile selezione di un biomarcatore con adeguata sensibilità e specificità clinica, o verso l'utilizzo di una combinazione di biomarcatori?	Giorgi Rossi Paolo Reggio Emilia	Credo che la distinzione diventerà sempre meno evidente. Già ora alcuni biomarcatori sono di fatto composti: dual staining p16/ki67; genotyping; metilazione. Sono alle porte anche biomarcatori “omici”, soprattutto nel campo della metilazione. Si potrebbero avere profili di rischio basati su migliaia di loci, in cui non solo si supera il concetto di singolo biomarcatore, ma anche il concetto di positivo/negativo e di fattore di rischio pre-esistente e legato al background genetico della donna e biomarcatore a valle dell'infezione HPV, caratteristico dello stato della lesione...non sono scenari molto lontani.
18		I biomarcatori potrebbero rappresentare la risposta ad una domanda clinica di test che orientino verso una migliore stratificazione del rischio di progressione?  Quale aspetto potrebbe migliorare?	Barbero Maggiorino Asti	Quest'incontro ha evidenziato molti aspetti innovativi e promettenti circa l'utilizzo di alcune procedure atte ad evidenziare e a stratificare il grado di rischio delle lesioni che vengono sottoposte a follow up.  Gli studi in corso ci diranno in tempi, speriamo brevi, quali delle diverse proposte potranno essere utilizzate sistematicamente nell'ambito dello screening organizzato.  Con la diffusione dell'HPV test nello screening per il cervico-carcinoma aumentano i casi di persistenza delle lesioni associate o meno alle alterazioni cellulari di basso grado (LSIL) con reperti colposcopici negativi o positivi per basso grado confermati o meno dall'eventuale esame istologico.  Specialmente nelle pazienti in età riproduttiva diventa molto importante la possibilità di trovare nuovi marcatori che consentano un più lungo e "tranquillo" follow up senza sottoporre le pazienti ad un trattamento che potrebbe influenzare in modo negativo il futuro outcome ostetrico.