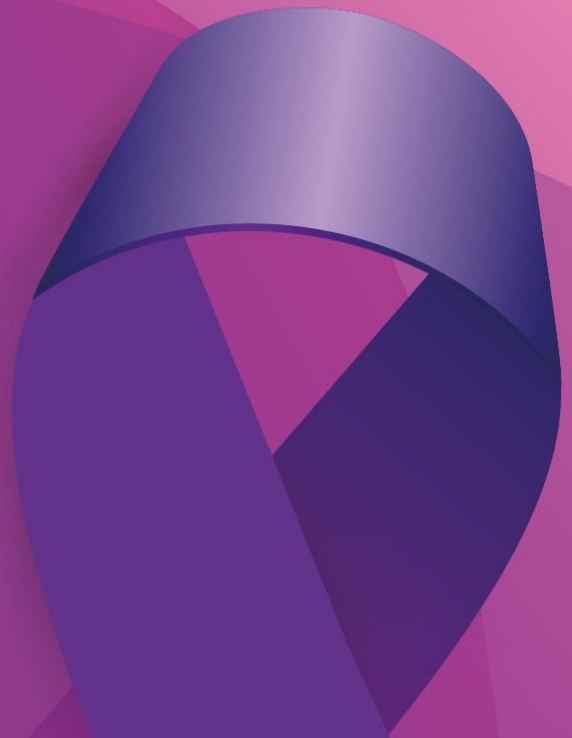
Insieme per la **Prevenzione** del **Tumore** della **Cervice**: **ricerca**, **innovazione**, **equità**



Regione Lombardia

Biagio Paolini

SC Anatomia Patologica 1 – Fondazione IRCSS Istituto Nazionale dei Tumori Milano

STUDIO PILOTA LILT-INT

IL CO-TEST HPV-PAPTEST COME STRUMENTO AFFIDABILE PER LA DIAGNOSI PRECOCE DEI CARCINOMI DELLA CERVICE UTERINA

-ANALISI PRELIMINARE DI 2000 CASI-

Dott. Biagio Paolini

SC Anatomia Patologica 1

Responsabile s.s. Digital Pathology

Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori – Milano

Regione Lombardia

ENTITA' DEL PROBLEMA

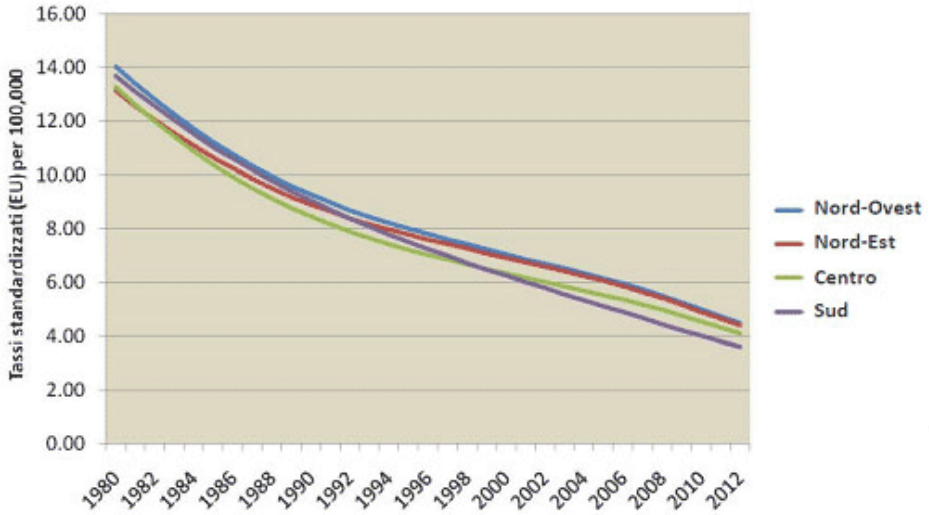
-1500 nuovi casi (4 - 5.3 per 100000) e circa 600 decessi (1,5 - 2,4 per 100000)

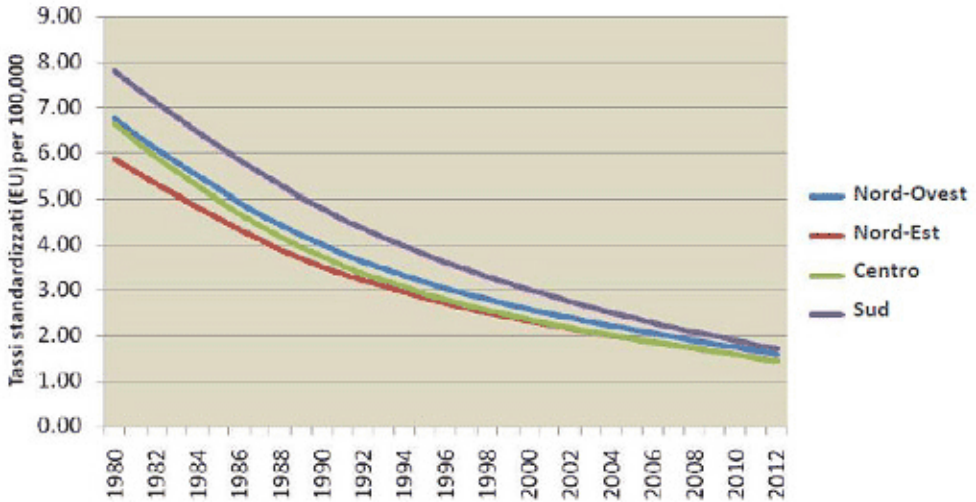
-Forte e continua riduzione della mortalità e dell'incidenza

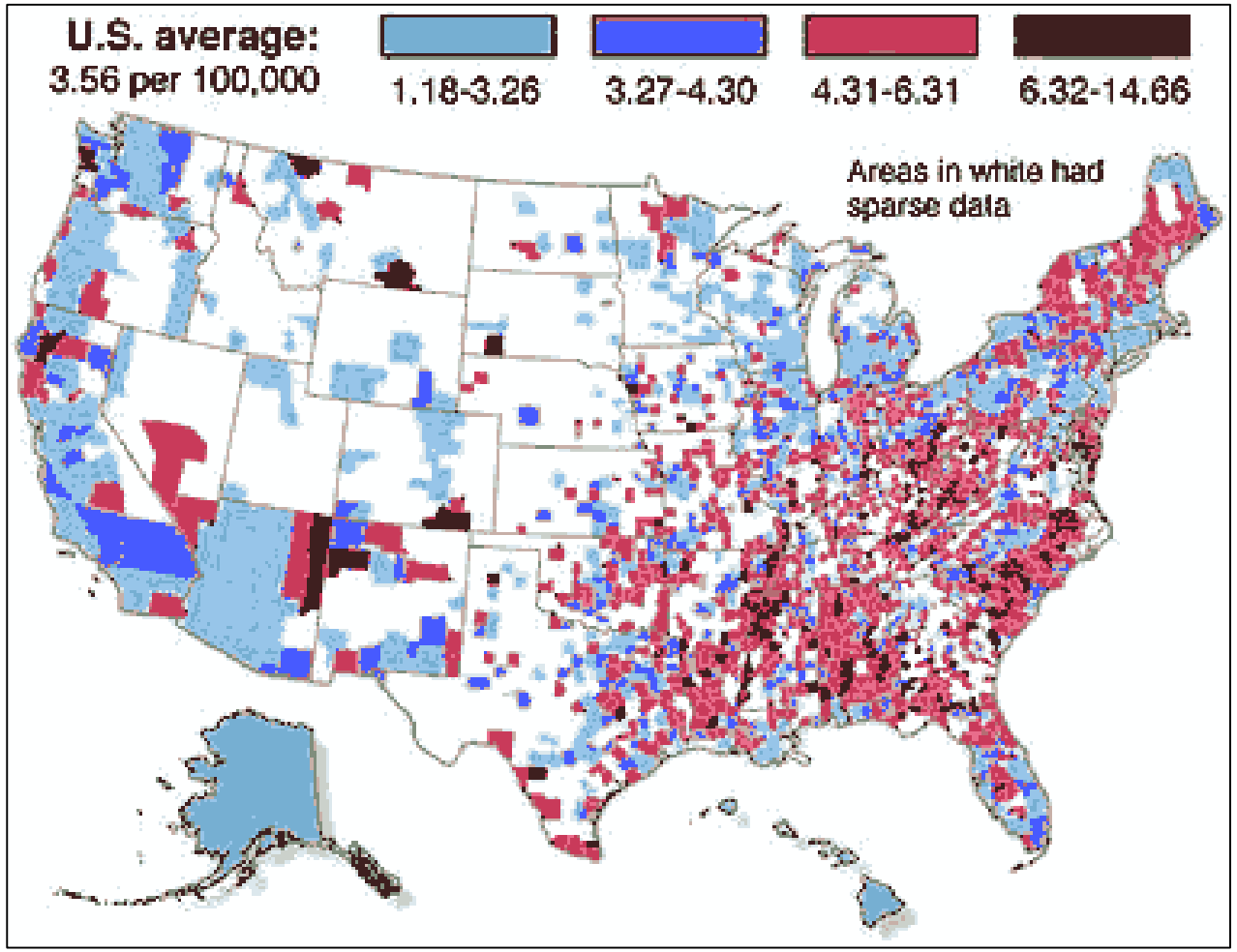
-riduzione più accentuata tra il 1980 e il 2000

-continua, seppur in misura minore, fino al 2012

-Andamenti riflettono l'effetto preventivo dei programmi organizzati di screening cervicale







-12.000 nuove diagnosi ogni anno

-4.200 decessi

-Massimo tra le donne di colore

-meno inclini a seguire screening

-George Papanicolaou descris icali nel 1928

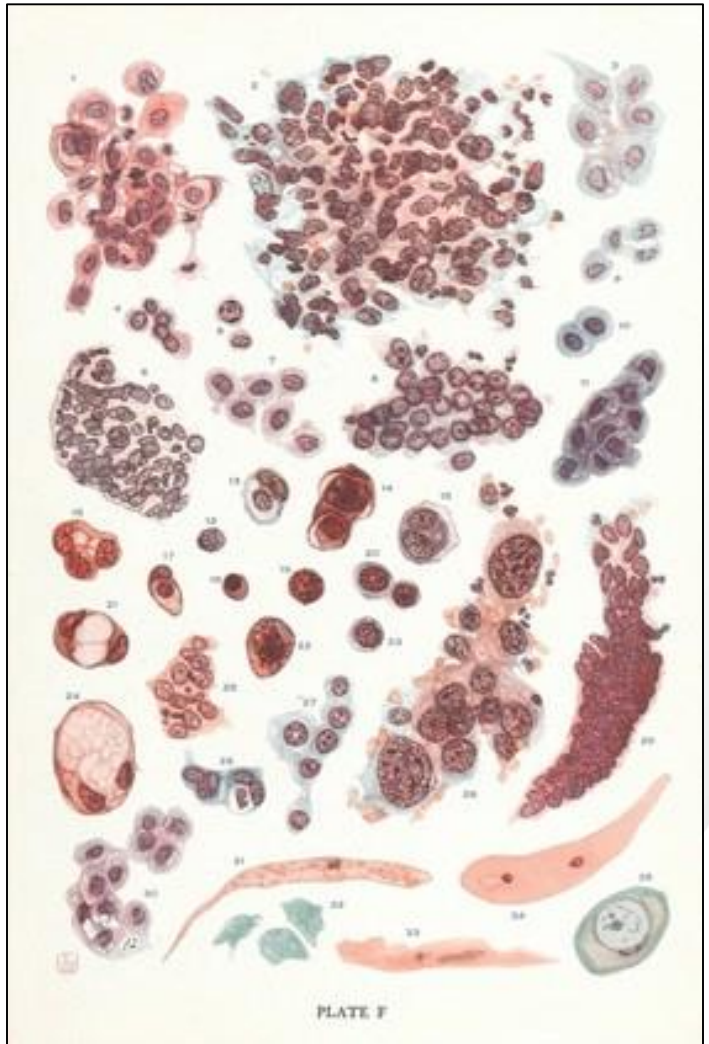
-La sua tecnica non fu ampian

George N. Papanicolaou (188
Pioneer of Cytology and Early

Christos S. Avdulla [1], Ntaniela Tachirai [2]

1. Department of Public Health, University of Patras, Patras, GRC 2
West Attica, Athens, GRC

Guinea Pig



-Fu solo negli anni '50 che i campioni cervicali furono prelevati per la prima volta in UK

-pur senza un programma adeguatamente organizzato

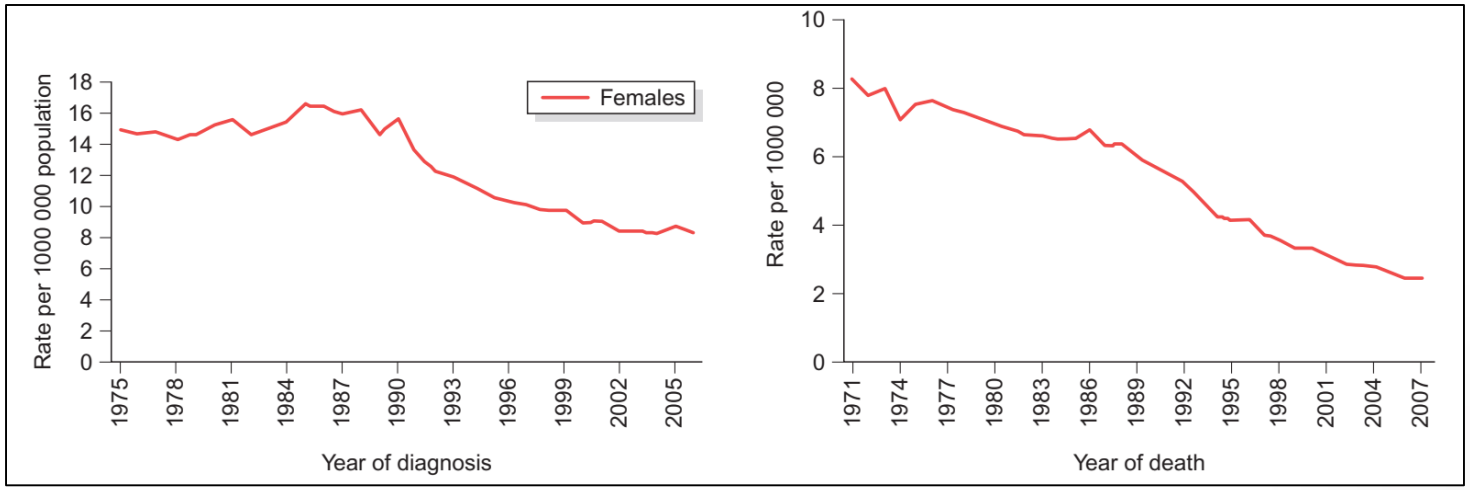
-Giovani donne

-Contraccezione o assistenza prenatale

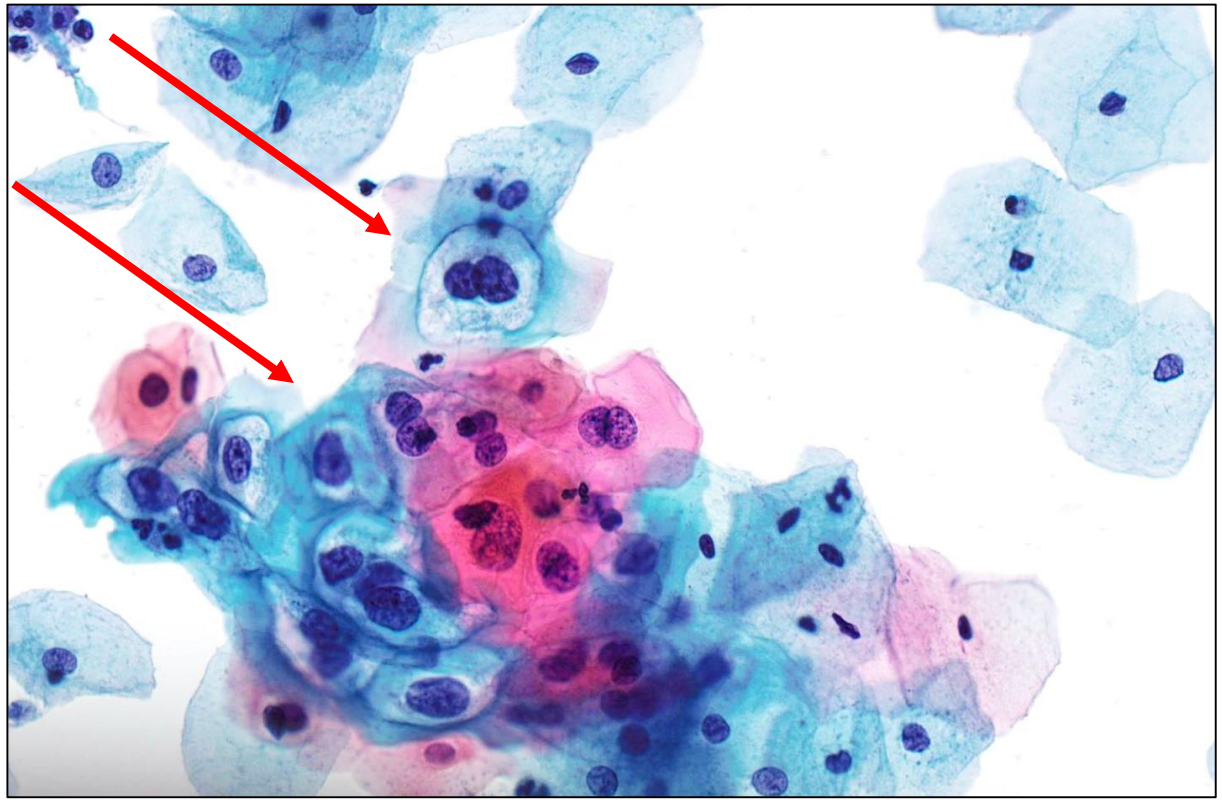
-Prevalentemente provenienti da gruppi socioeconomici più elevati

-basso rischio di carcinoma cervicale

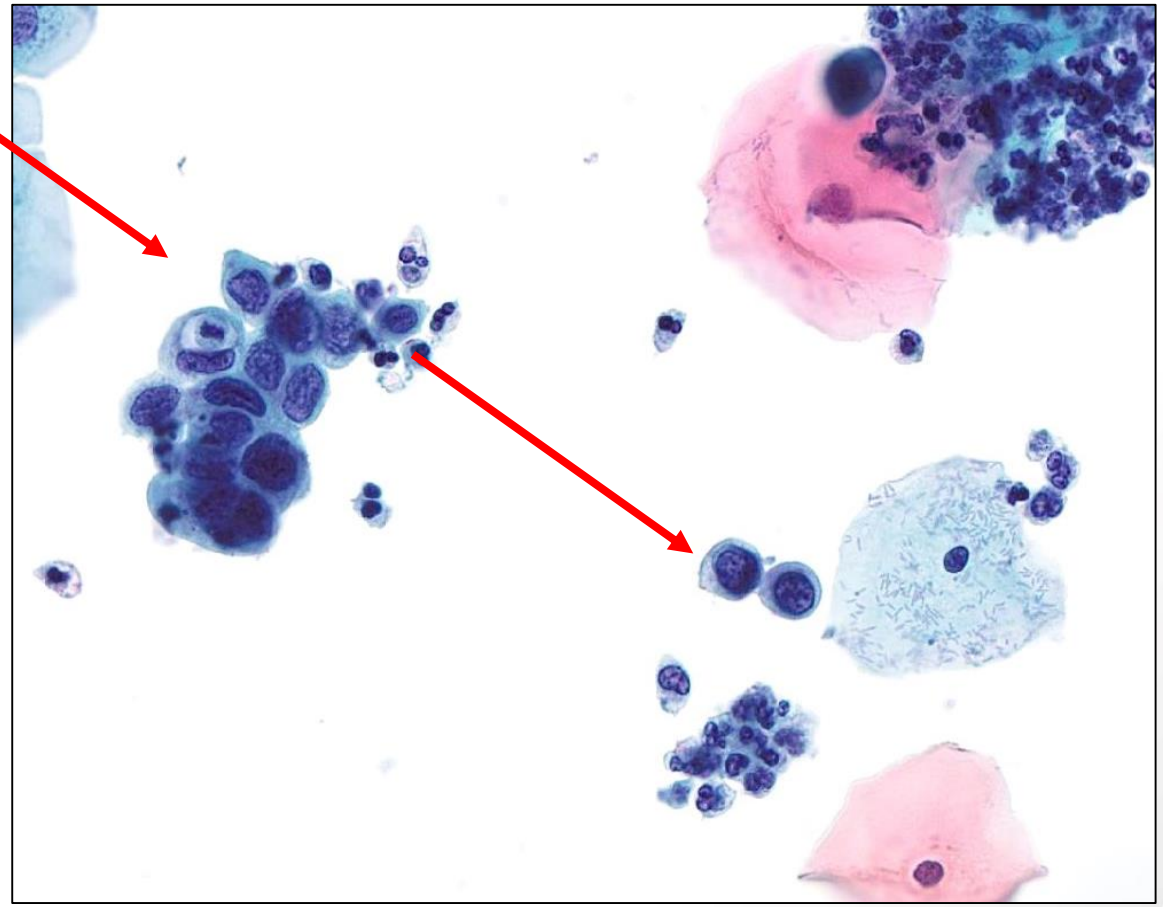
-Tuttavia, divenne evidente che nelle aree in cui esisteva un programma ben organizzato, come ad esempio in Scozia, la mortalità per carcinoma della cervice iniziò a diminuire



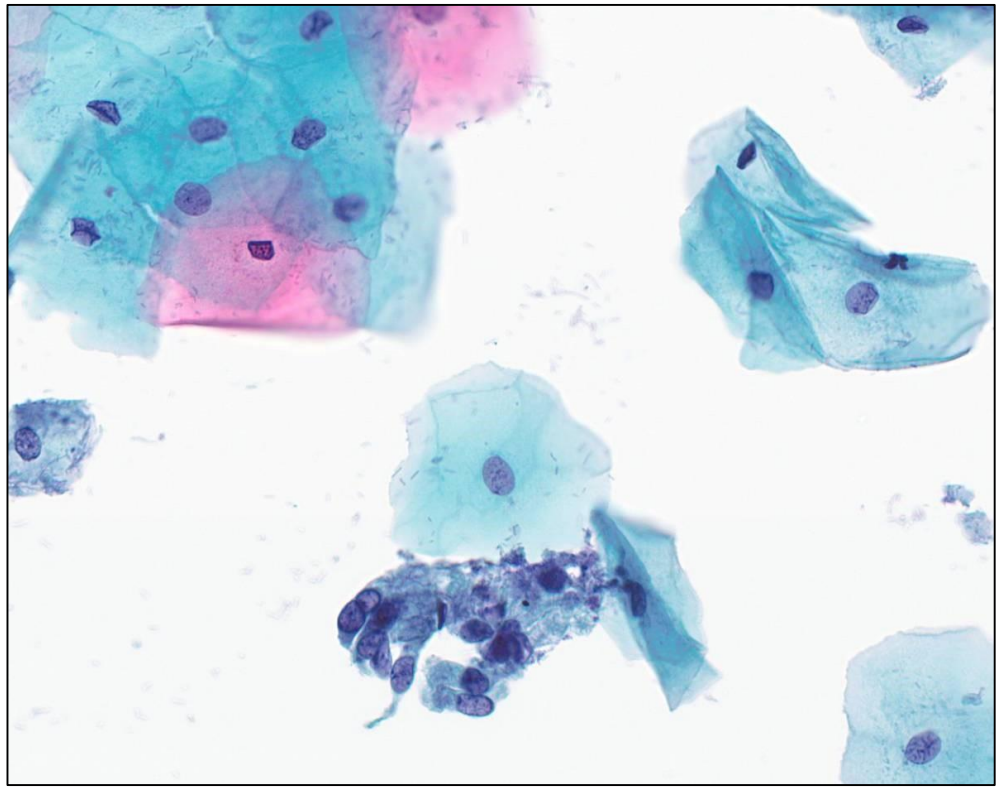
Regione Lombardia



Displasia di basso grado - LSIL

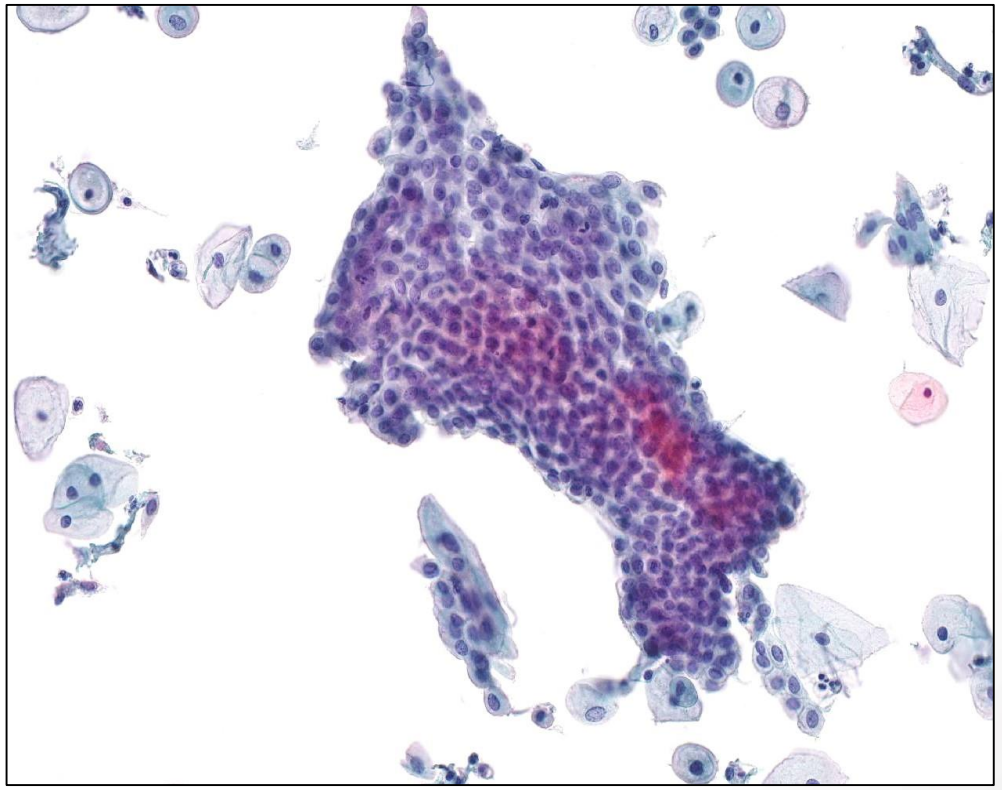


Displasia di alto grado - HSIL



Cellule normali

HPV-HR +



Cellule normali

HPV-HR -

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 80, pp. 3812–3815, June 1983
Medical Sciences

A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions

(human papillomaviruses/low-stringency hybridization/molecular cloning/genital tumors)

MATTHIAS DÜRST, LUTZ GISSMANN, HANS IKENBERG, AND HARALD ZUR HAUSEN*

Institut für Virologie, Zentrum für Hygiene, Universität Freiburg, Hermann-Herder-Strasse 11, 7800 Freiburg, Federal Republic of Germany

Table 1. Occurrence of HPV DNA in genital tumors

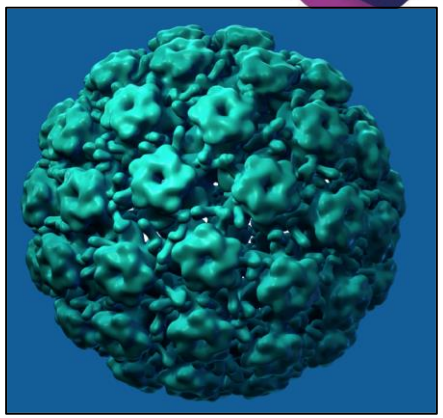
Tumor sample	% HPV 16-positive: Stringent	% HPV 16-positive: Relaxed	Total % positive tumors (including HPV 6, 8, 9, 10, and 11)
Cervical cancer, Germany	61.1 (11/18)	66.7 (12/18)	72.2 (13/18)
Cervical cancer, Kenya and Brazil	34.8 (8/23)	43.5 (10/23)	43.5 (10/23)
Cervical carcinoma *in situ*	22.2 (2/9)	44.4 (4/9)	55.6 (5/9)
Cervical dysplasia	10.0 (2/20)	40.0 (8/20)	40.0 (8/20)
Vulval cancer	28.6 (2/7)	42.9 (3/7)	42.9 (3/7)
Penile cancer	25.0 (1/4)	25.0 (1/4)	25.0 (1/4)
Condyloma acuminatum	6.1 (2/33)	81.8* (27/33)	90.9 (30/33)

Regione Lombardia

Human papillomavirus infection: Epidemiology, biology, host interactions, cancer development, prevention, and therapeutics

Rev Med Virol. 2024;e2537.

Jonas Wolf | Lucas Felipe Kist | Samanta Brangel Pereira | Marilze Alves Quessada | Helena Petek | Arthur Pille | Juçara Gasparetto Maccari | Mohamed Parrini Mutlaq | Luiz Antonio Nasi



-Una delle infezioni sessualmente trasmesse più comuni a livello globale

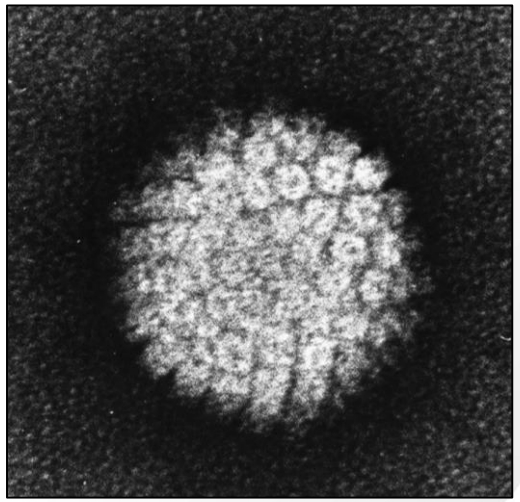
-Virus a DNA che infetta le cellule epiteliali di diverse mucose e la cute

-Numerosissimi sierotipi

-Specie-specifico

-Classificato in tipi ad alto e basso rischio

-in relazione all'associazione con il rischio di sviluppare alcuni tumori maligni



-Piccoli virus privi di mantello, con genoma a DNA bicatenario, geneticamente stabili

-Oltre 200 sierotipi, circa 60 infettano la mucosa genitale

-I genotipi a basso rischio causano lesioni genitali (condilomi) che raramente cancerizzano

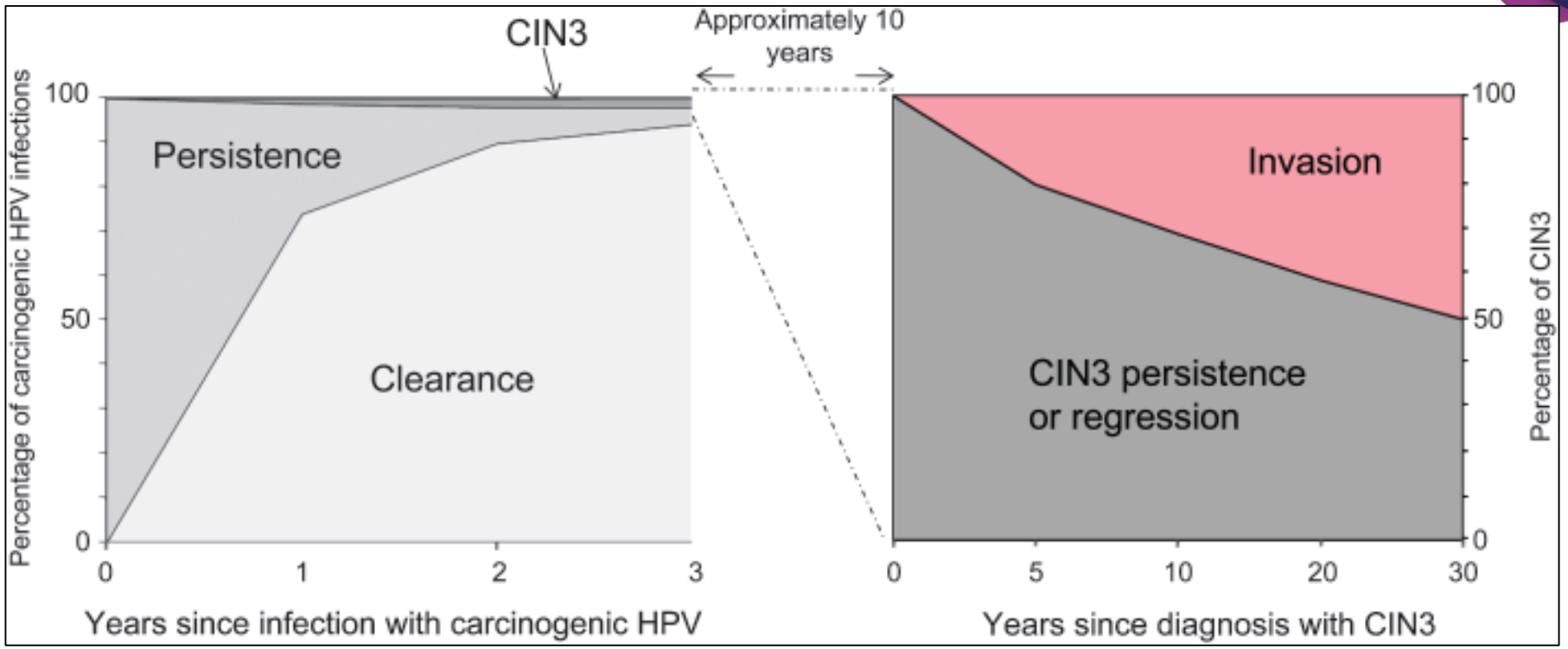
-18 sierotipi ad alto rischio (associati a > 85% dei casi di carcinoma della cervice uterina)

TABLE 1 HPV types, diseases, and carcinogenic degree.

Tropism	Disease	HPV types[a]
Cutaneotropic (low risk)	Plantar warts	1, 2, 4, 63
	Common warts	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
	Vulgar warts (plane)	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
	Other skin lesions (cysts, epidermal, laryngeal carcinoma)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
	Epidermodysplasia verruciformis	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
	Recurrent respiratory papillomatosis	6, 11
	Papillomas/Conjunctive carcinomas	6,11, 16
	Condyloma acuminata (genital warts)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Mucosotropic (high risk)	Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) non-specific	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
	Low risk (CIN I)	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
	High risk (CIN II)	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
	Cervical carcinoma	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

Rev Med Virol. 2024;e2537.

Regione Lombardia



-Il 50% delle infezioni da HPV scompare dopo 6-12 mesi
-Il 90% scompare dopo 2-3 anni
-Nel 25-33% delle donne HPV HR+ è presente una citologia anomala
-Il rischio di cancro aumenta significativamente per le infezioni persistenti più di 5 anni

Mark Schiffman et al. J Natl Cancer Inst, 2011

Regione Lombardia

-Genoma a DNA circolare a doppia catena di circa 8 kb di soli 8 geni

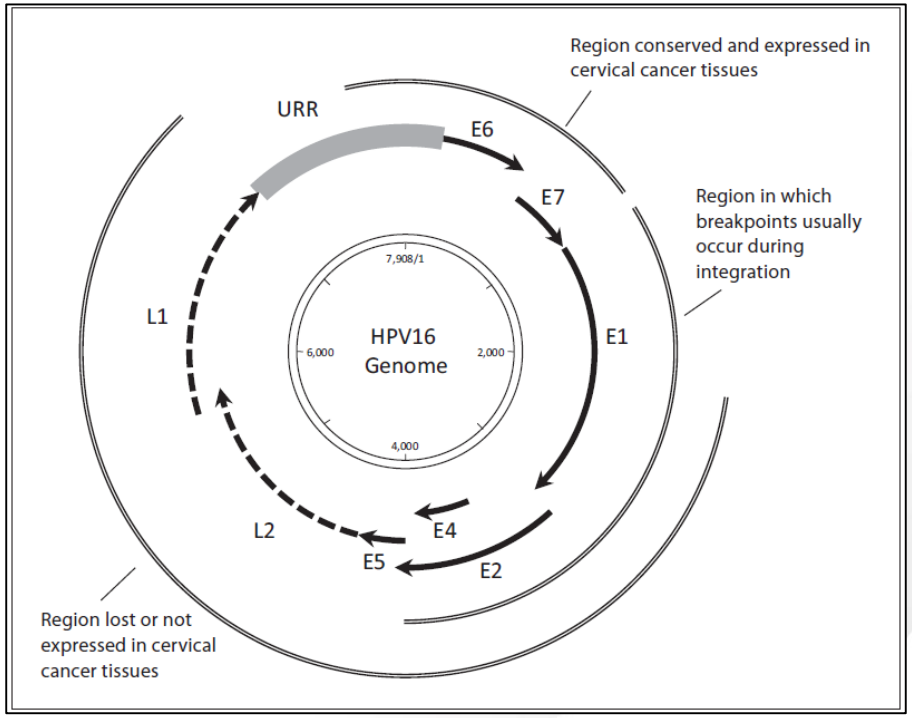
-Le regioni codificanti vengono classificate in precoci (E) e tardive (L)

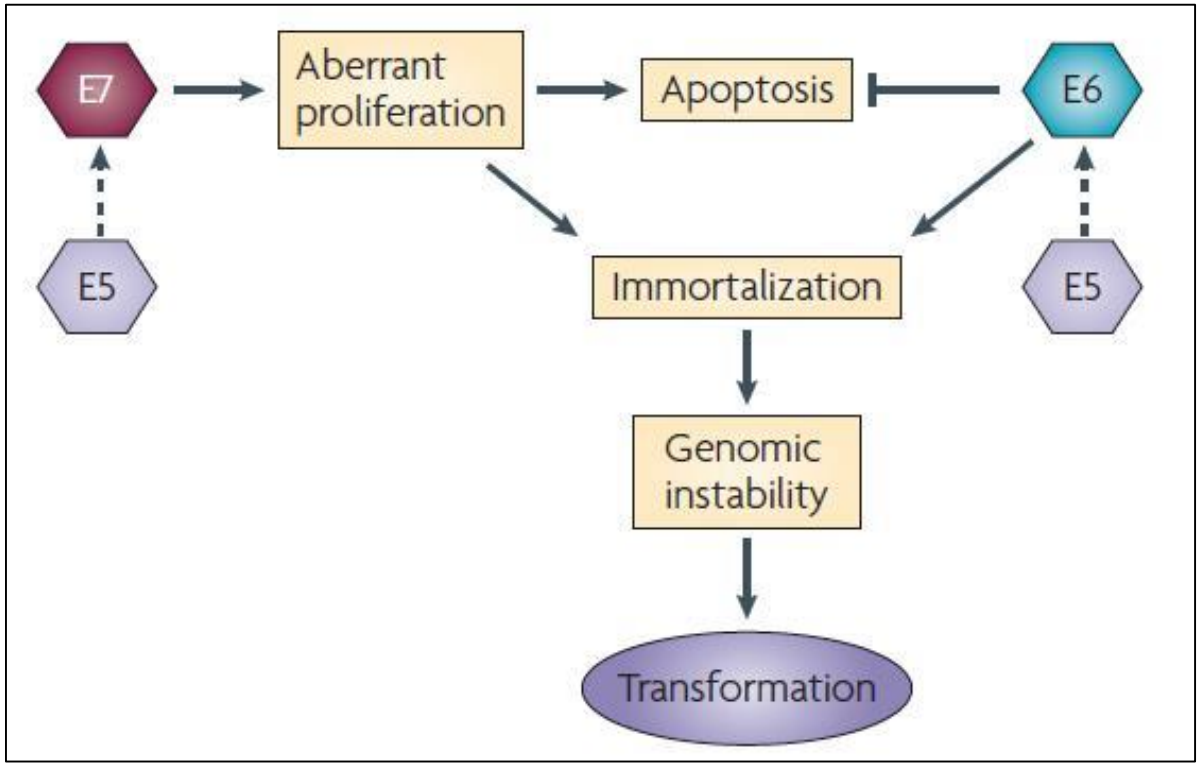
-La regione E viene espressa nelle cellule infettate

-codifica per proteine funzionali / regolatorie (E1-E7)

-La regione L1-L2 codifica per le proteine strutturali

-viene espressa solo nelle infezioni produttive





-E6 ed E7 creano un ambiente permissivo

-Degradazione di RB
-iperproliferazione

-Degrazione di P53
-blocco apoptosi, instabilità genomica

-Blocco dei telomeri (TERT)
-immortalizzazione

INTEGRAZIONE DEL GENOMA VIRALE

-L'integrazione è random nel genoma dell'ospite

-I geni di HPV si perdono nel processo di integrazione ad eccezione di E6 e di E7

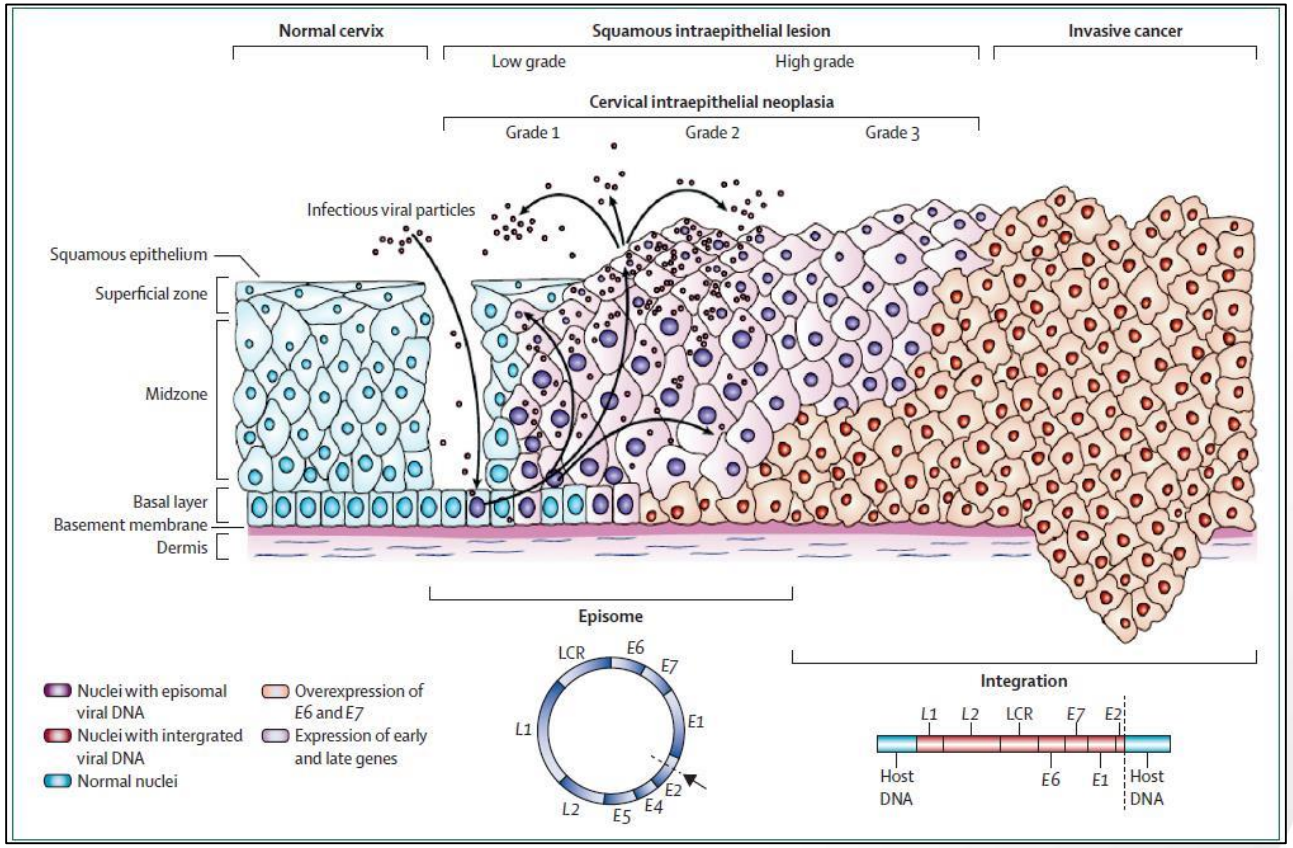
AMBIENTE PERMISSIVO

-Mantenimento della proliferazione cellulare

-Instabilità genomica delle cellule infettate

-Blocco dell'apoptosi

-Immunoevasione



Crosbie EJ et al. Lancet, 2013

IMMUNOEVASIONE

-Bassi livelli di replicazione virale nello strato basale

-Diminuita espressione di MHC1 indotta da E5

-Soppressione della risposta all'interferon e al TNF-α indotta da HPV

-Attivazione di citochine soppressive e di Tregs da parte di E6 ed E7

PERCHE' USARE UN TEST HPV-HR mRNA?

-Prestazioni cliniche valutate in più studi indipendenti

-Detection rate di CIN2 e CIN3 equivalente ad test a DNA

-Minor tasso di re-invio a colposcopia

Journal of Clinical Virology 87 (2017) 23–29

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Aptima HPV Assay versus Hybrid Capture® 2 HPV test for primary cervical cancer screening in the HPV FOCAL trial

Darrel A. Cook[a,b], Laurie W. Smith[a], Jennifer Law[c], Wendy Mei[c], Dirk J. van Niekerk[a,c,d], Kathy Ceballos[a,c,d], Lovedeep Gondara[a], Eduardo L. Franco[e], Andrew J. Coldman[a,d], Gina S. Ogilvie[b,d], Dan Jang[f], Max Chernesky[f], Mel Krajden[b,c,d,*]

PERCHE' USARE UN TEST HPV-HR mRNA?

Analisi "pooled di HPV-HR"
16/18/31/33/35/39/45/51/52/
56/58/59/66/68

Group 1 Carcinogenic to Humans	Group 2A Probably Carcinogenic to Humans	Group 2B Possibly Carcinogenic to Humans
Sufficient evidence of carcinogenicity in humans and in experimental animals	Limited evidence of carcinogenicity in humans and sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals	Limited evidence of carcinogenicity in humans and insufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals
111 agents, including 8 biological agents: - Epstein-Barr virus - Helicobacter pylori (infection with) - Hepatitis B virus (chronic infection with) - Hepatitis C virus (chronic infection with) - Human immunodeficiency virus type 1 (infection with) - Human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 - Human T-cell lymphotropic virus type I -Kaposi sarcoma herpesvirus	**65 agents, including 3 biological agents:** -Human papillomavirus type 68 -Malaria (caused by infection with Plasmodium falciparum in holoendemic areas) -Merkel cell polyomavirus	**274 agents, including 6 biological agents:** -BK polyomavirus -Human immunodeficiency virus type 2 (infection with) -Human papillomavirus types 5 and 8 (in patients with epidermodysplasia verruciformis) -Human papillomavirus types 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82 -Human papillomavirus types 30, 34, 69, 85, 97 (Classified by phylogenetic analogy to the HPV genus alpha types classified in Group 1) -JC polyomavirus

PERCHE' USARE UN TEST HPV-HR mRNA?

-Training di base anche per personale non specializzato in biologia molecolare

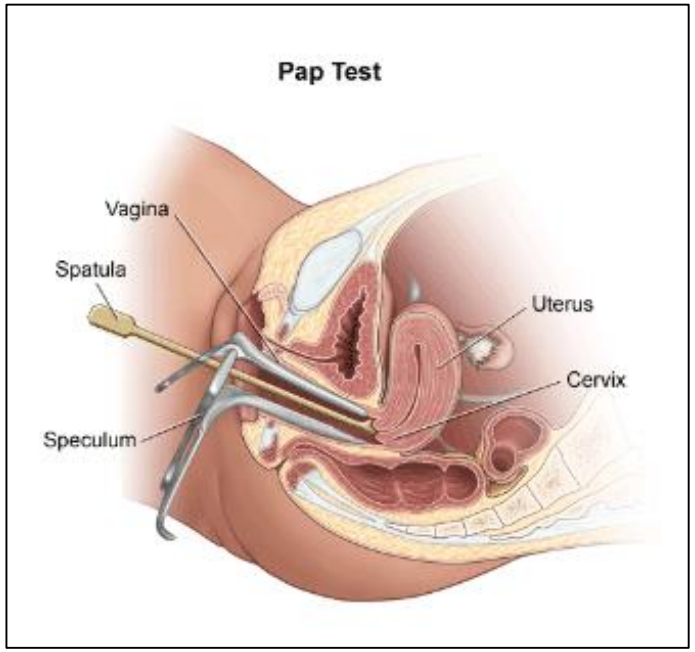
-Automatizzazione completa, elevata processività e rapido work-flow

-Singolo prelievo, unico vials (lo stesso della citologia), scalabilità

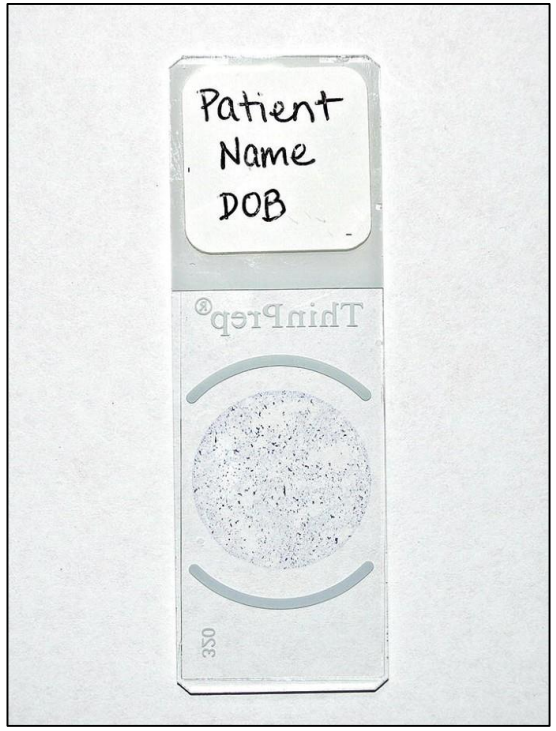
-Tempi di risposta rapidi (7-10 giorni)

-Possibilità di genotipizzare HPV16, HPV18/HPV45 (stesso materiale, stessa piattaforma)

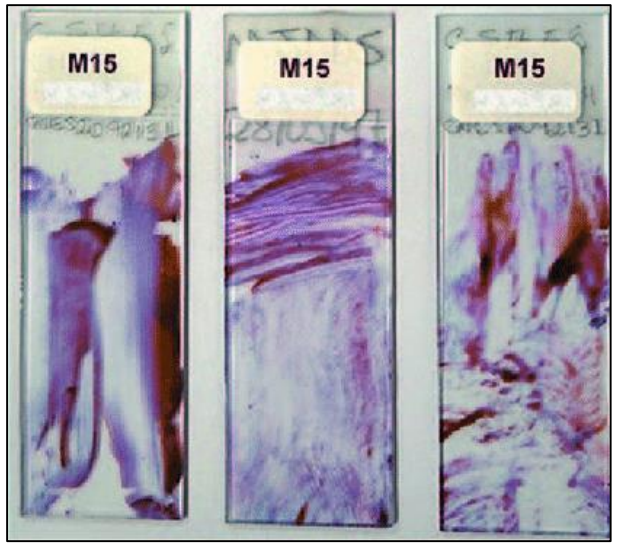
PERCHE' UN TEST HPV-HR mRNA ASSOCIATO ALLA CITOLOGIA IN FASE LIQUIDA?



Citologia in fase liquida



Striscio convenzionale



PERCHE' UN TEST HPV-HR mRNA ASSOCIATO ALLA CITOLOGIA IN FASE LIQUIDA?

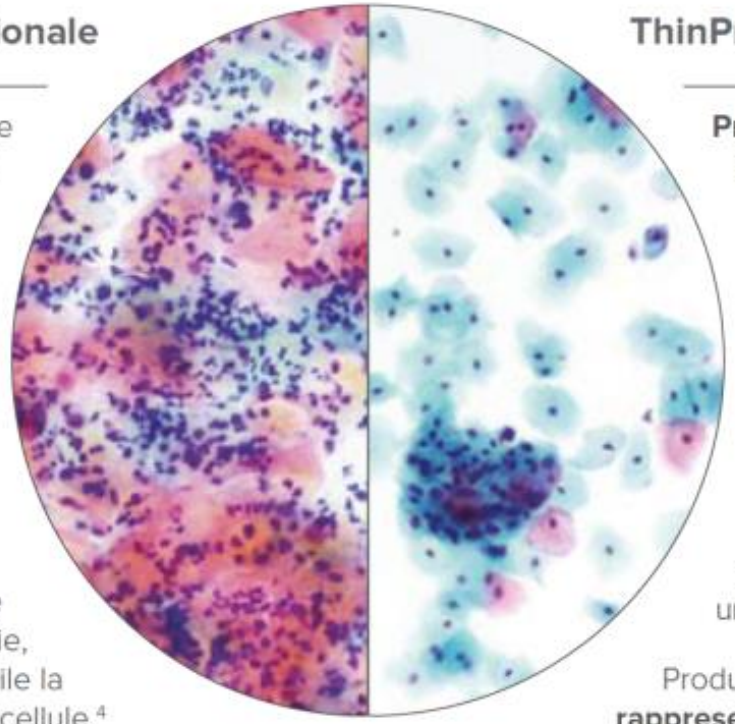
Pap test convenzionale

Solo una frazione del campione raccolto viene utilizzata per la preparazione del vetrino.[3]

Gli artefatti da striscio spesso portano a **scarsa qualità delle cellule**.[3]

I vetrini **possono non rappresentare** il campione prelevato in modo accurato e quindi non riflettere la reale condizione della paziente.[3]

Le cellule sul vetrino possono risultare sovrapposte o **oscurate** da emazie, muco o altro materiale, rendendo difficile la visualizzazione delle cellule.[4]



ThinPrep® Pap Test

Praticamente tutto il campione raccolto è mantenuto nella fiala ThinPrep.[3]

L'immediata fissazione **preserva la qualità delle cellule.**[3]

I vetrini rappresentano l'intero campione in modo **accurato** e con maggiore possibilità di individuare le displasie.[3]

Le cellule sul vetrino sono **libere** da elementi oscuranti e distribuite in modo uniforme per facilitarne la visualizzazione.[2]

Produce campioni multipli, tutti **rappresentativi** e **riproducibili**.[3]

PERCHE' UN TEST HPV-HR mRNA ASSOCIATO ALLA CITOLOGIA IN FASE LIQUIDA?

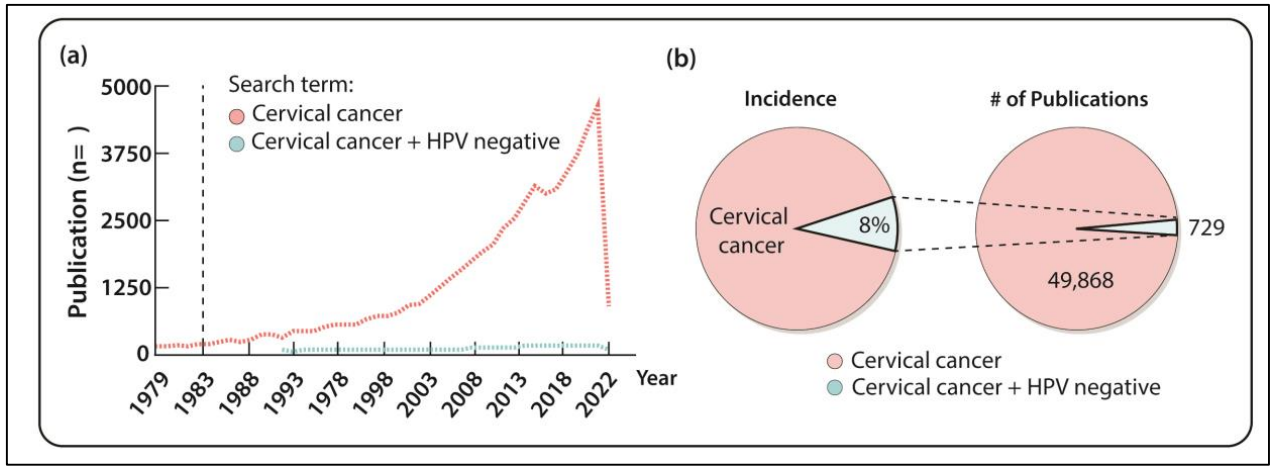
BMB Reports

BMB Rep. 2022; 55(9): 429-438
www.bmbreports.org

Invited Mini Review

Untold story of human cervical cancers: HPV-negative cervical cancer

Jae-Eun Lee[1], Yein Chung[2], Siyeon Rhee[3,] & Tae-Hyung Kim[4,5,*]*



-Dato difficile da stimare (5-18%)

-Sequenziare (PCR) ogni caso

-Lesioni precursore poco conosciute

-Istotipi aggressivi, poco responsivi

-Stadio localmente avanzato

Regione Lombardia

PERCHE' UN TEST HPV-HR mRNA ASSOCIATO ALLA CITOLOGIA IN FASE LIQUIDA?

-Potenzialità della citologia in fase liquida (riduzione inadeguati, migliore morfologia)

-Report integrato (morfologia – molecolare), commenti clinici operativi

-Storage a tempo potenzialmente indefinito dei vials

-Creazione di casistiche di validazione controllate ed omogenee
- -per setting epidemiologici
- -per clinica
- -per controllo bioptico

PERCHE' UN TEST HPV-HR mRNA ASSOCIATO ALLA CITOLOGIA IN FASE LIQUIDA?

-Integrazione con rete di *Digital Pathology*

-Applicazione algoritmi intelligenza artificiale e analisi di immagine automatizzata

-Generazione di dati epidemiologici e di ricerca clinico-patologica

-*Core facility* per tutti i laboratori collegali alla rete LILT

- **-accesso a *second opinion* di un centro terziario**
- **-*repository* dei preparati citologici allestiti (e refertati) altrove**
- **-"*Hub&Spoke*"per l'esecuzione decentralizzata del test molecolare HPV**

LILT
LEGA ITALIANA PER LA LOTTA CONTRO I TUMORI
prevenire è vivere

MILANO
MONZA
BRIANZA

IL CO-TEST CITOLOGIA STRATO SOTTILE + HPV mRNA E6/E7 NELLA PREVENZIONE PRIMARIA DEL CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA E SUA IMPLEMENTAZIONE CON DIGITAL PATHOLOGY

POPOLAZIONE ELEGIBILE

-Co-test per le donne fra i 25-30 e i 65 anni

-prima diagnosi
-follow-up di L-SIL
-follow-up post-cono
-follow-up di chirurgia

-< 25 e > 65 Pap-Test strato sottile ev. test molecolare

SETTING CLINICI PARTICOLARI

-Peri-menopausa o post-menopausa

-H-SIL post-trattamento,"Test Of Cure, TOC"

-Citologia indeterminata, sospetta o L-SIL

-Sensibilità e VPP, VPN sovrapponibili ai test HPV-DNA

-Specificità lievemente superiore ai test HPV-DNA

uicc global cancer control

IJC International Journal of Cancer

The APTIMA HPV assay *versus* the Hybrid Capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: A meta-analysis of the diagnostic accuracy

Marc Arbyn[1], Jolien Roelens[1], Kate Cuschieri[2], Jack Cuzick[3], Ann Szarewski[3], Sam Ratnam[4], Miriam Reuschenbach[5], Suzanne Belinson[6], Jerome L. Belinson[6] and Joseph Monsonego[7]

Asciutto *et al. BMC Cancer* (2020) 20:1025
https://doi.org/10.1186/s12885-020-07498-6

BMC Cancer

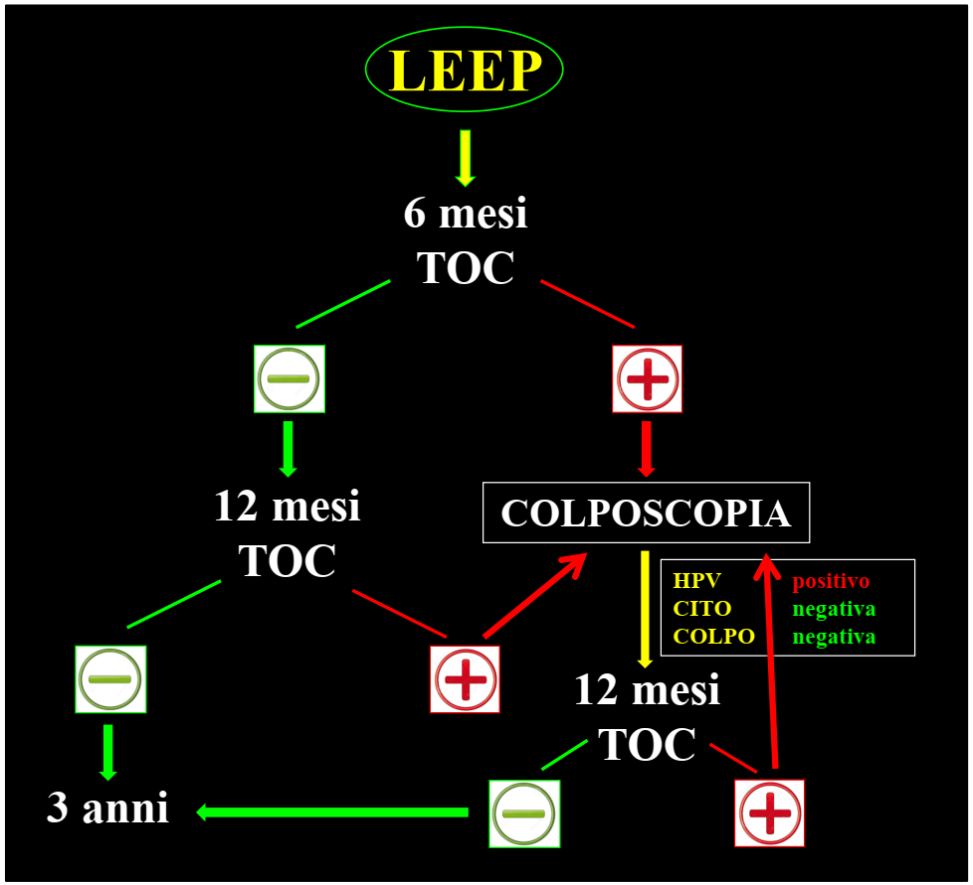
RESEARCH ARTICLE Open Access

14-type HPV mRNA test in triage of HPV DNA-positive postmenopausal women with normal cytology

Katrin Christine Asciutto[1*], Christer Borgfeldt[1] and Ola Forslund[2]

LILT LEGA ITALIANA PER LA LOTTA CONTRO I TUMORI prevenire è vivere MILANO MONZA BRIANZA

Regione Lombardia



AOGS
Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica

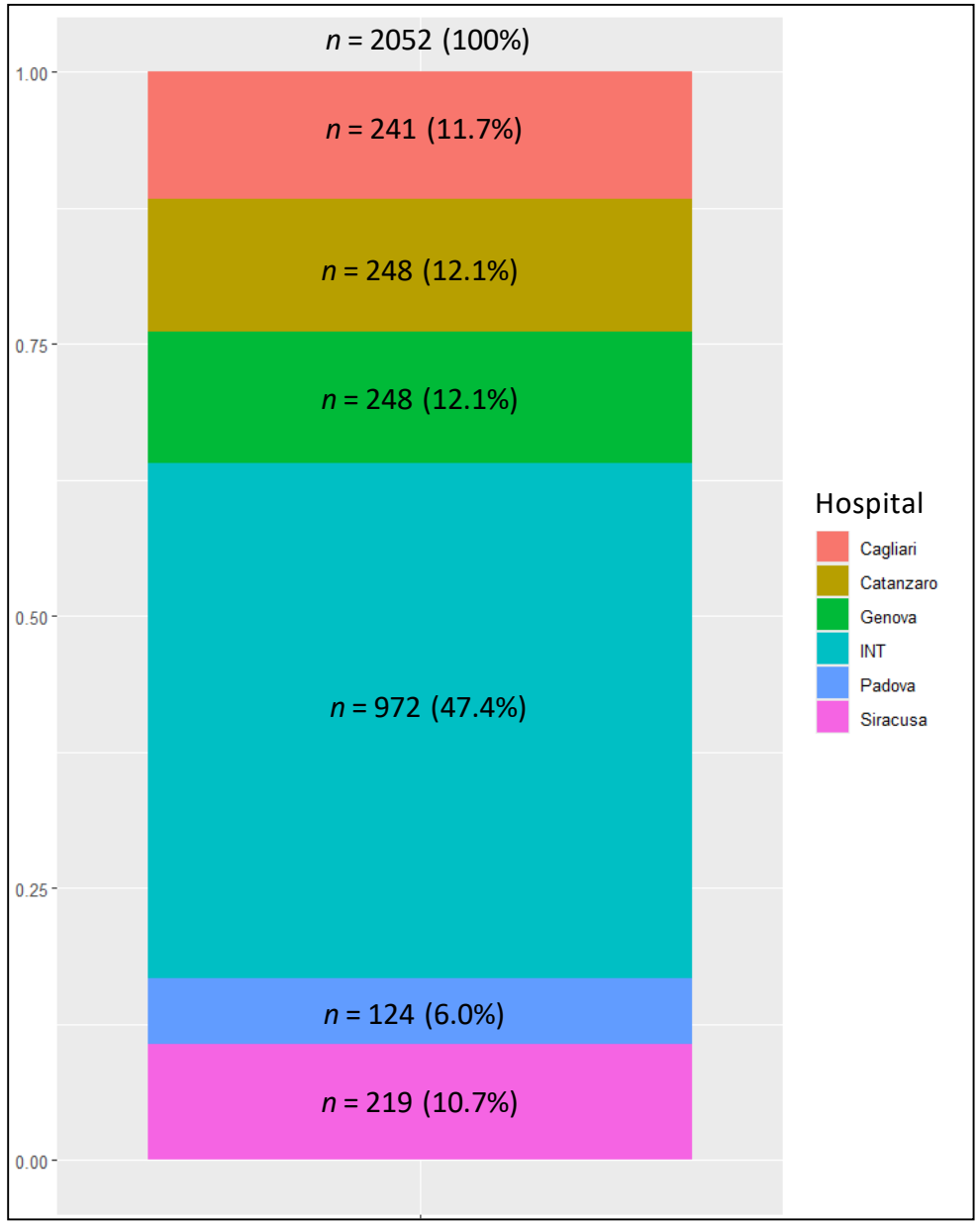
AOGS ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Follow up with HPV test and cytology as test of cure, 6 months after conization, is reliable

KATRIN CHRISTINE ASCIUTTO[1], EMIR HENIC[2], LOTTEN DARLIN[1], OLA FORSLUND[3] & CHRISTER BORGFELDT[1]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, Skåne University Hospital, Lund, [2]Reproductive Medicine Center, Skåne University Hospital, Lund, and [3]Department of Microbiology and Laboratory Medicine, Skåne University Hospital, Lund, Sweden

Un co-test negativo 6 mesi dopo un trattamento per H-SIL è indice affidabile per spostare nel tempo i follow-up



TOTALE	2052
Cagliari	241 (11.7)
Catanzaro	248 (12.1)
Genova	248 (12.1)
Milano	972 (47.4)
Padova	124 (6.0)
Siracusa	219 (10.7)

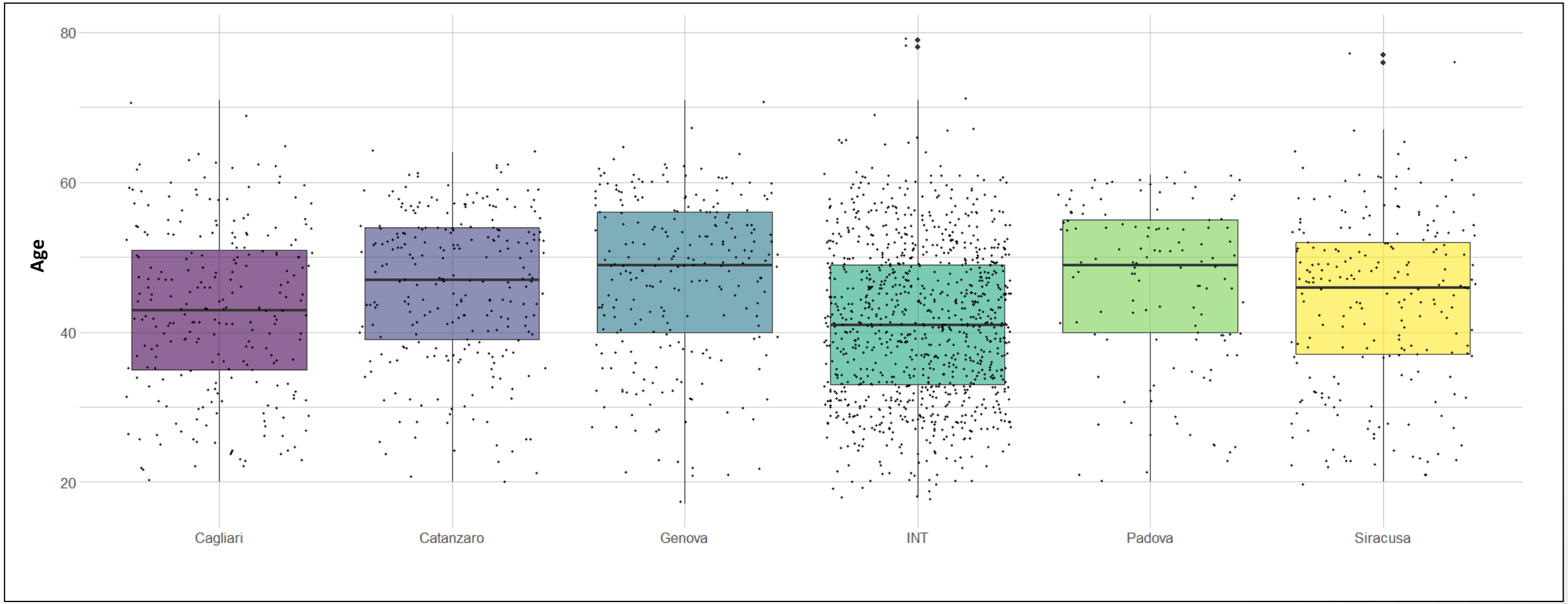
Regione Lombardia

	All patients	HPV Assay Negative	HPV Assay Positive
	2052 (100)	1830 (100)	221 (100)
Cagliari	241 (11.7)	210 (11.5)	31 (14.0)
Catanzaro	248 (12.1)	229 (12.5)	19 (8.6)
Genova	248 (12.1)	229 (12.5)	19 (8.6)
Milano	972 (47.4)	838 (45.8)	133 (60.2)
Padova	124 (6.0)	118 (6.5)	6 (2.7)
Siracusa	219 (10.7)	206 (11.3)	13 (5.9)

% HPV+	**10,76%**
Cagliari	12,86%
Catanzaro	7,66%
Genova	7,66%
Milano	13,68%
Padova	4,83%
Siracusa	5,93%

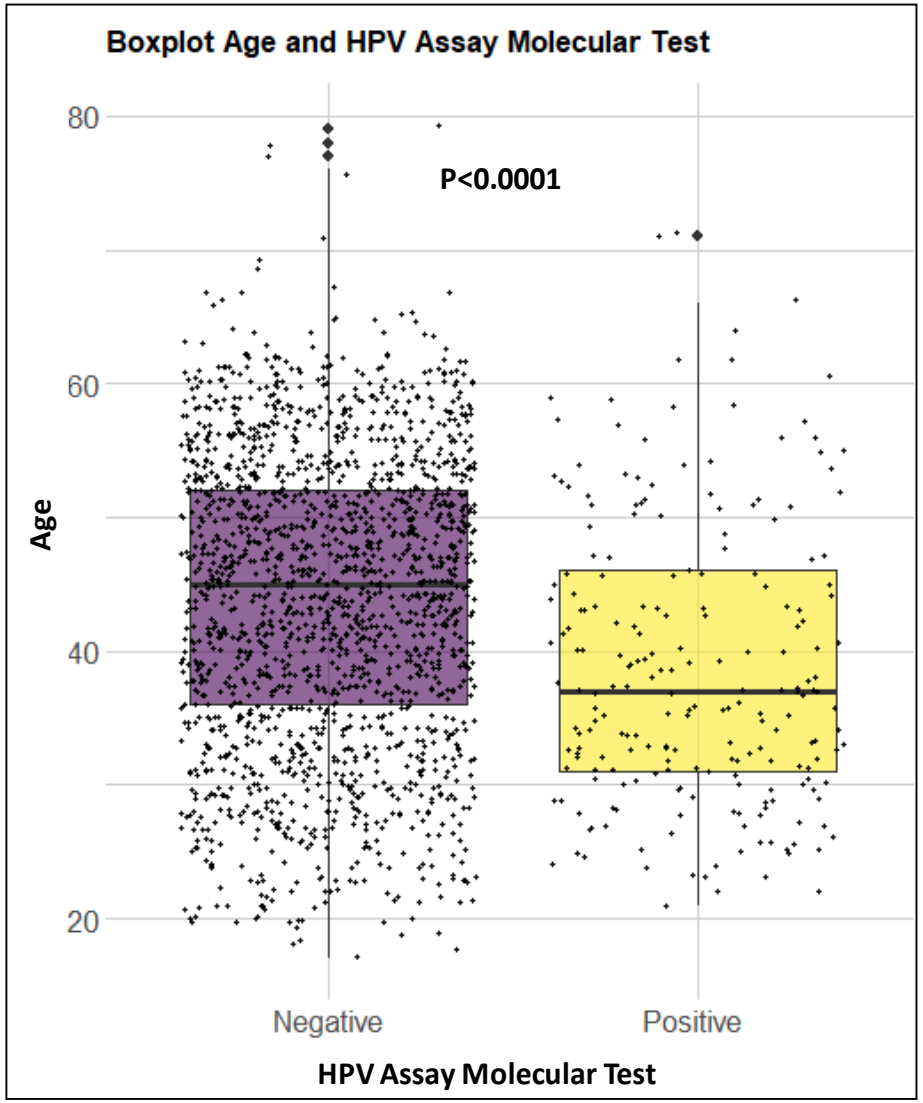
Regione Lombardia

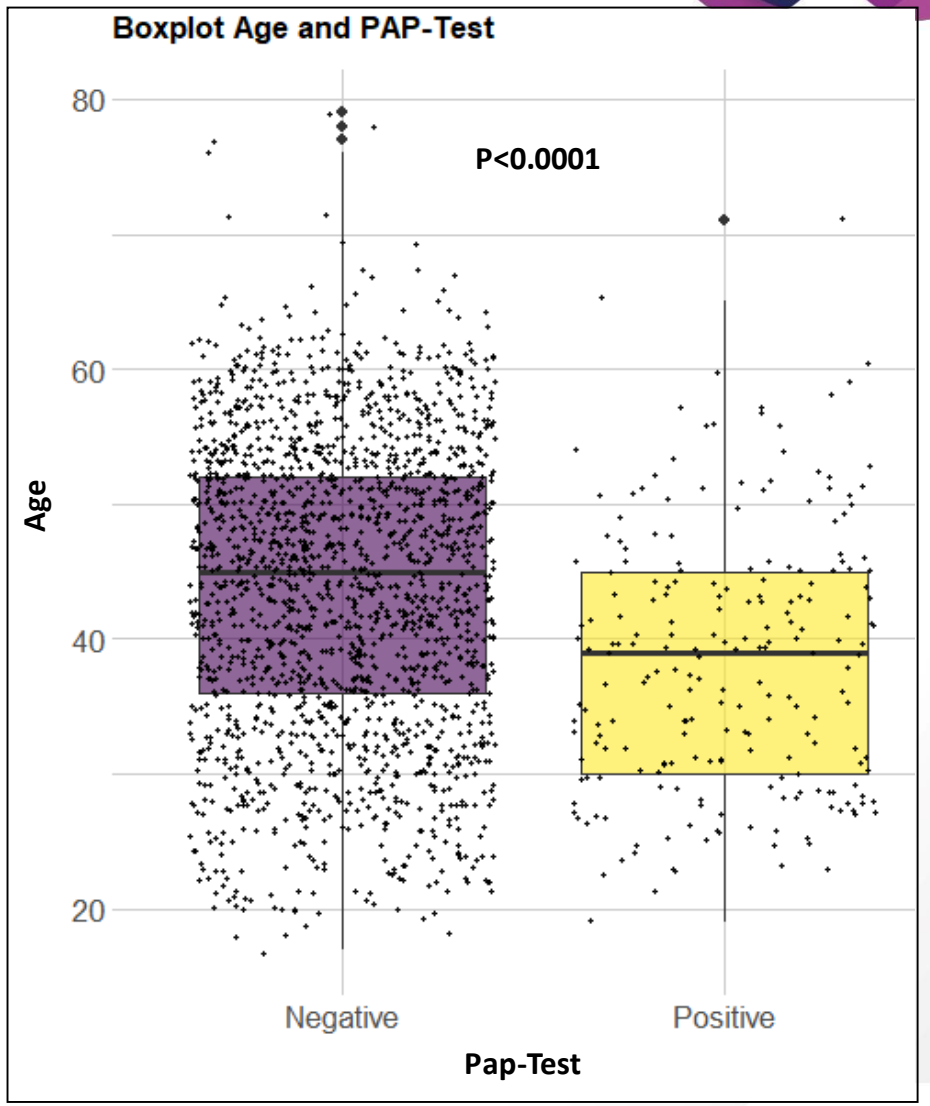
Age	**All patients**	**HPV Assay Negative**	**HPV Assay Positive**	**P-value***
Mean [SD]	43.4	44.0 [10.8]	38.8 [10.5]	<0.0001



LILT Milano è il gruppo con donne significativamente più giovani rispetto a tutti gli altri ospedali

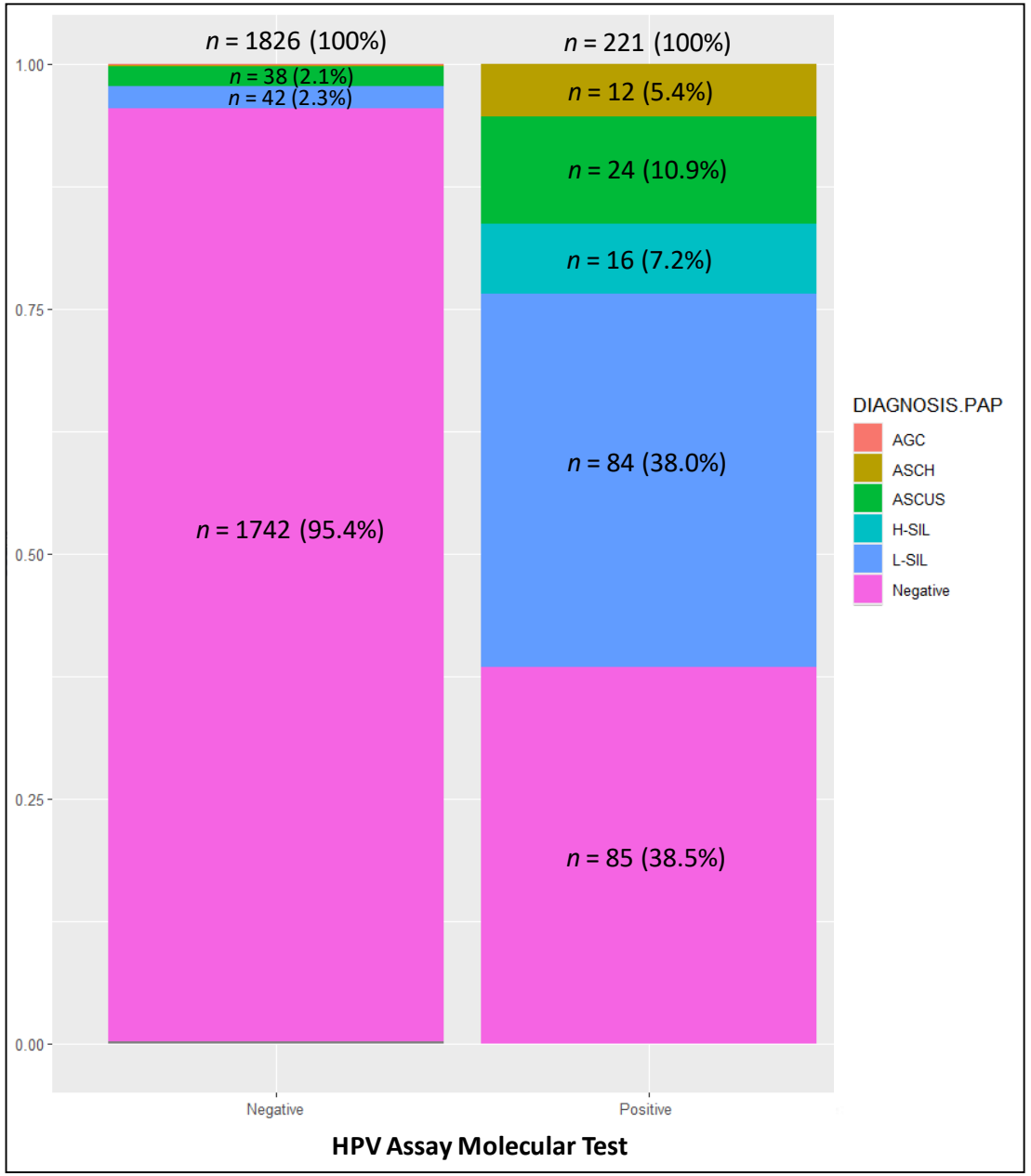
Regione Lombardia


Boxplot Age and HPV Assay Molecular Test
P<0.0001
Age
80
60
40
20
Negative
Positive
HPV Assay Molecular Test


Boxplot Age and PAP-Test
P<0.0001
Age
80
60
40
20
Negative
Positive
Pap-Test

	All patients	HPV Assay Negative	HPV Assay Positive	P-value*
Total	2052 (100)	1830 (100)	221 (100)	
Pap-Test				
Negative	1828 (89.3)	1742 (95.4)	85 (38.5)	
Positive	221 (10.7)	84 (4.6)	136 (61.5)	<0.0001
% Pap inadeguati		**0,22%**	**0**	

Regione Lombardia



Questo barplot mostra le percentuali di diagnosi di PAP Test nei gruppi HPV Negativo e Positivo

-Nel gruppo HPV- possiamo osservare che anche il paptest è negativo nel 95.4% dei casi

-Nel gruppo HPV+ troviamo diverse diagnosi: ASCH (5.4%), ASCUS (10.9%), H-SIL (7.2%), L-SIL (38%) ma anche un pap-test negativo (38.5%)

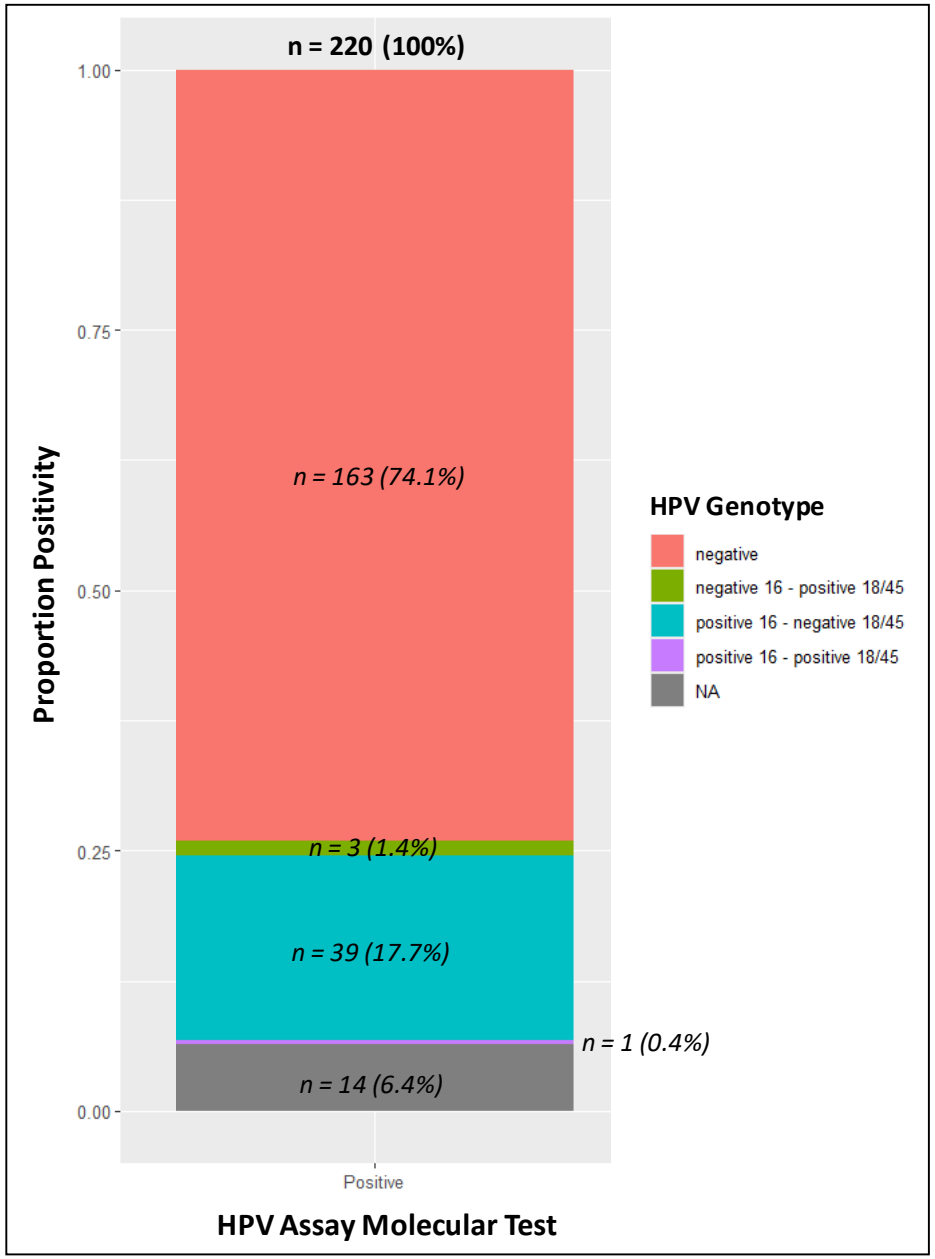
Regione Lombardia

Pap-Test		HPV Assay Negative	HPV Assay Positive
Negative	1828 (89.3)	1742 (95.4)	85 (38.5)
AGC	2 (0.1)	2 (0.1)	0 (0.0)
ASCH	14 (0.7)	2 (0.1)	12 (5.4)
ASCUS	62 (3.0)	38 (2.1)	24 (10.9)
H-SIL	16 (0.8)	0 (0.0)	16 (7.2)
L-SIL	126 (6.2)	42 (2.3)	84 (38.0)

HPV-
PapTest negativo 95,4%

HPV+
PapTest anomalo 61,5%

Regione Lombardia



Regione Lombardia

HPV Vaccine		HPV -	HPV +	p-value
No	1641 (87.2)	1465 (87.9)	175 (81.8)	
Yes	240 (12.8)	201 (12.1)	39 (18.2)	0.01497

	HPV Assay Positive and Vaccine positive
Total	39 (100)
Pap-Test	
Negative	11 (28.2)
Positive	28 (71.8)
Pap-Test Diagnosis	
Negative	11 (28.2)
ASCH	2 (5.1)
ASCUS	5 (12.8)
H-SIL	2 (5.1)
L-SIL	19 (48.7)

ONGOING…

-Raccolta dati colposcopie ed esiti biopsie, ove disponibili, di tutte le pazienti

-Analisi statistica esito biopsia *VS* Co-test

-Comparazione con casisitca Co-test INT non LILT (>2900 pazienti) *VS* LILT

CASISTICA CO-TEST INT

		All patients	HPV Assay Negative	HPV Assay Positive	P-value
Total		2906 (100)	2223 (100)	683 (100)	
Age					
	Mean [SD]	48	48 [11.9]	47 [12.7]	0.10

%HPV+ 20,5%

	All patients	HPV Assay Negative	HPV Assay Positive	P-value*
Total	2906 (100)	2223 (100)	683 (100)	
Pap-Test				
Negative	2211 (76.4)	2003 (90.6)	203 (30.0)	
Positive	683 (23.6)	207 (9.4)	473 (70.0)	<0.0001
% Pap inadeguati		**0,59%**	**1,03%**	

CONCLUSIONI

-Test HPV mRNA: sensibilità simile con maggiore specificità rispetto ai test HPV DNA
-potenziale per lo screening primario del cancro cervicale ogni 5 anni

-Maggiore specificità del test mRNA: più efficace per il triage di LSIL e ASCUS
-esame affidabile per valutazione II livello screening

-Co-testing post-LEEP: test affidabile per la guarigione
-follow-up a 3 anni senza HSIL o cancro ne conferma l'efficacia

Experience is what you get when you don't get what you want

Randy Pausch

biagio.paolini@istitutotumori.mi.it