

Il test di scelta per triage delle donne con pap ASC-US o LSIL

Il Pap test si veste di molecolare

A cura del gruppo IHSG
(Italian HPV Study Group)
www.ihsg.it, info@ihsg.it

Lo screening per il carcinoma del collo dell'utero ha utilizzato fino ad ora come test di base il Pap test. Tale metodica ha dimostrato con il tempo la sua efficacia nel ridurre l'incidenza e la mortalità per il cervico-carcinoma. Il Pap test, però, con i suoi oltre 50 anni di storia presenta alcune limitazioni quali la soggettività, la variabilità e la relativamente bassa sensibilità. Il Pap test, inoltre, è stato introdotto quando ancora non si sapeva che il Papillomavirus umano (HPV) fosse la causa necessaria del carcinoma del collo dell'utero.

Il riconoscimento del ruolo eziopatogenetico del virus ha aperto nuovi scenari preventivi e ha portato allo sviluppo di metodologie atte a riconoscere l'HPV ad alto rischio (HR-HPV) ed il suo effetto a livello della cervice uterina. Sono stati quindi introdotti test che ricercano la presenza del genoma di uno dei 13 ceppi oncogeni di HPV. La presenza di uno di tali ceppi aumenta di 100 volte il rischio di una donna di sviluppare una lesione pre-tumorale e tumorale al collo dell'utero. Sappiamo, però, che l'infezione da HPV è comunissima mentre le lesioni pre-tumorali e il tumore sono un evento raro; infatti, la maggior parte delle infezioni da HPV sono transitorie e non causano alterazioni precancerose. Per questo sono stati sviluppati biomarcatori d'infezione persistente o di displasia che permettono d'identificare quelle infezioni che hanno caratteristiche trasformanti. Tra

I sei componenti dell'Italian HPV Study Group (IHSG)



Luciano Mariani



Paolo Cristoforoni



Massimo Origoni



Mario Sideri

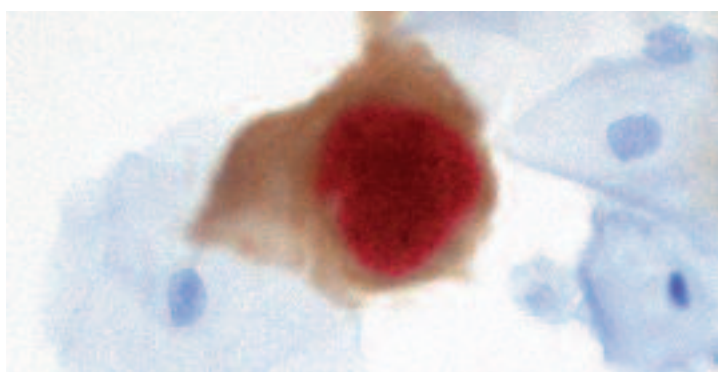


Silvano Costa



Mario Preti

Valutazione citologica dell'iperespressione di p16^{INK4a} nel triage del pap borderline



Cellula a doppia colorazione; colorazione citoplasmatica marrone di p16^{INK4a} e colorazione nucleare rossa di Ki-67

questi biomarcatori c'è la proteina p16^{INK4a} normalmente espressa in quantità molto basse, quasi impercettibili all'immunoistochimica, ma che viene iperespressa in cellule displastiche a causa dell'attività dell'oncogene E7 dell'HR-HPV; è stato dimostrato che l'immunocolorazione della p16^{INK4a} fornisce una precisa identificazione delle cellule epiteliali cervicali displastiche su vetrino. I ginecologi hanno molto chiara la sfida clinica rappresentata dal riscontro di un esito citologico SIL di basso grado oppure ASC-US. Mentre il test HPV può essere utilizzato nei casi di ASC-US, vi sono ancora difficoltà nella gestione ottimale delle SIL di basso grado e degli esiti borderline nelle donne giovani. La gestione degli esiti borderline ancora oggi è una problematica lontana da una soluzione semplice ed efficace. La novità è che ora c'è un test che usa due biomarcatori, p16^{INK4a} e Ki-67 su uno stesso vetrino citologico. Questo test, chiamato CINtec[®] PLUS (mtm laboratories, Heidelberg, Germania), ha dimostrato di essere estremamente preciso nell'identificare neoplasie cervicali intraepiteliali di alto grado (CIN2+) nel-

le donne con risultati del Pap ASC-US o SIL di basso grado. Numerosi studi hanno dimostrato l'accuratezza del test. Il più importante è stato pubblicato recentemente in *Cancer Cytopathology*.

Background

La citologia SIL di basso grado (L-SIL) rappresenta il 2-3% di tutte le diagnosi citologiche. È ben noto che il 15-20% di L-SIL nasconde una sottostante CIN2 o una diagnosi peggiore. Tuttavia, l'invio diretto alla colposcopia basato sull'esito citologico porta ad una significativa quota di overdiagnosi e conseguente sovratattamento. Il test del Papillomavirus umano (HPV) è noto per essere molto sensibile nel rilevare la presenza di sottostanti CIN2+ in risultati citologici lievemente anormali del Pap, ma mostra una positività in un'alta percentuale di casi (sino all'85%) L-SIL ed è perciò inefficace. L'ASC-US rappresenta un altro 2-4% di tutte le interpretazioni citologiche; il 6-10% dei casi ASC-US possono nascondere una sottostante CIN2 o lesione più severa. Come nel caso delle L-SIL, anche nell'ASC-US, le opzioni gestionali comprendono la ripetizione del test a sei mesi oppure l'invio diretto alla colposcopia; in più, nella gestione dell'ASC-US c'è anche l'opzione di triage con il test HR-HPV. Anche con l'uso di questo test rimane una percentuale del 40-50% dei casi con risultati positivi da inviare a colposcopia.

Le caratteristiche del nuovo test

Il CINtec[®] PLUS test risponde

a questa necessità combinando la rilevazione della proteina p16^{INK4a}, la cui sovra-espressione è legata alla trasformazione oncogena del papilloma virus ad alto rischio con un marker di proliferazione (Ki-67). In termini più semplici, la simultanea positività ai due marcatori è un segnale che il controllo del ciclo cellulare si è interrotto ed indica la presenza di una CIN di alto grado (CIN2 o lesione più severa). In normali condizioni fisiologiche, l'espressione di una delle due proteine esclude l'altra; la loro co-espressione identifica le cellule oncologicamente trasformate dal papilloma virus sui normali vetrini del Pap test, indipendentemente dall'interpretazione morfologica soggettiva. Le cellule con doppia immunoreattività sono facili da localizzare e interpretare nel campione citologico, come mostrato nella Figura 1. La colorazione citoplasmatica marrone segnala sovra-espressione di p16^{INK4a}, mentre un segnale rosso nucleare indica l'espressione di Ki-67. Ciò elimina la variabilità lettore-dipendente di un'interpretazione dei parametri basata sulla morfologia, aggiungendo un alto livello di certezza offerto dal CINtec[®] PLUS test. Ciò rende il Pap test uno strumento oggettivo di indagine delle alterazioni molecolari indotte dal virus del papilloma ad alto rischio. L'identificazione di almeno una cellula con doppia colorazione è un indicatore per procedere all'esame colposcopico.

Pubblicazioni recenti

Lo studio EEMAPS (European Equivocal Mild Atypical Pap Study) pubblicato su *Cancer Cytopathology* ha confermato questi vantaggi del CINtec[®] PLUS test. Obiettivo dello studio era quello di confrontare la doppia colorazione immuno-citochimica di p16/Ki-67 con il test HPV in casi di citologia ASC-US o L-SIL su di un totale di 776 casi. La presenza di uno o più cellule con doppia immunoreattività è stata valutata come un risultato positivo al test, indipendentemente dalla morfologia. I risultati dei test sono stati correlati all'istologia della biopsia mirata in colposcopia. Gli autori concludono che il CINtec[®] PLUS test identifica con elevata precisione il gruppo di donne con CIN di alto grado nei casi di citologia ASC-US o L-SIL ed è superiore al test HPV. CINtec[®] PLUS ha fornito una sensibilità paragonabile al test HPV, ma una specificità nettamente superiore. Questi risultati sottolineano il potenziale diagnostico del test d'immunocitochimica applicato al Pap test nello screening cervicale.

Lo studio della Sapienza di Roma pubblicato su *Experimental and Therapeutic Medicine* ha valutato 191 pazienti affette da ASC-US con positività ai genotipi vi-

rali ad alto rischio (84 casi) oppure affette da SIL di basso grado (107 casi). La percentuale di casi ASC-US e di L-SIL positivi alla p16^{INK4a} è risultato simile (circa il 40%) e tutte le pazienti sono state inviate a colposcopia. Dei 96 casi con colposcopia positiva (39 ASC-US e 57 L-SIL) tutti i CIN2 (n = 18) ed i CIN3 (n = 3) sono risultati positivi alla p16^{INK4a}, tranne due CIN2; dei 95 pazienti (45 ASCUS e 50 LSIL) con colposcopia negativa e con follow-up colposcopico o citologico a 1 anno, un solo caso di CIN2 (Pap test di invio L-SIL) è stato osservato nei casi negativi alla p16^{INK4a} (1/62; 1,6%). Gli autori concludono affermando che la determinazione della p16^{INK4a} ha un ruolo importante nella gestione degli esiti citologici borderline ASC-US, HPV test positivi e SIL di basso grado; un risultato negativo per p16^{INK4a} rappresenta un marker dell'assenza di una CIN di alto grado e sottolinea il valore diagnostico-prognostico del marcatore; infatti nessuna delle donne p16^{INK4a} negative ha sviluppato una CIN2 nel follow-up ad un anno.

Conclusioni

Sulla base di questi dati, che dimostrano una chiara correlazione tra i risultati del test e la presenza o assenza di CIN2+, il CINtec[®] PLUS test dovrebbe essere il test di scelta per triage delle donne con pap ASC-US o LSIL. Una delle caratteristiche salienti del test è che non richiede prelievi aggiuntivi e può essere utilizzato sullo stesso vetrino allestito per il Pap test. Questa tecnologia rappresenta un importante progresso per la gestione della paziente, offrendo una performance di sensibilità pari al test di ricerca molecolare del HPV ma con una maggiore specificità.

Per saperne di più

- Schmidt et al. p16/Ki-67 Dual-Stain Cytology in the Triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou Cytology Results. From the European Equivocal or Mildly Abnormal Papanicolaou Cytology Study. *Cancer Cytopathol* 2011; 119 in press
- Denton et al. The Sensitivity and Specificity of p16^{INK4a} Cytology vs HPV Testing for Detecting High-grade Cervical Disease in the Triage of ASC-US and LSIL Pap Cytology Results. *Am J Clin Pathol* 2010; 134:12-21
- Lukic A, Sbenaglia G, Carico E, di Properzio M, Giarnieri E, Frega A, Nobili F, Moscarini M and Giovagnoli MR. Prediction of clinical outcome using p16^{INK4a} immunocytochemical expression in low-grade squamous intraepithelial lesions and high-risk HPV-positive atypical squamous cells of undetermined significance in patients with and without colposcopic evident cervical disease. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2011; 2: 853-858