

CORSO

HPV test come test primario di screening.

Preparazione del personale prelevatore dello screening del cervico-carcinoma
Prevenzione Serena

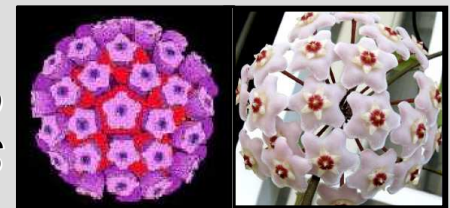


Papillomavirus umano: cosa è importante ricordare e comunicare

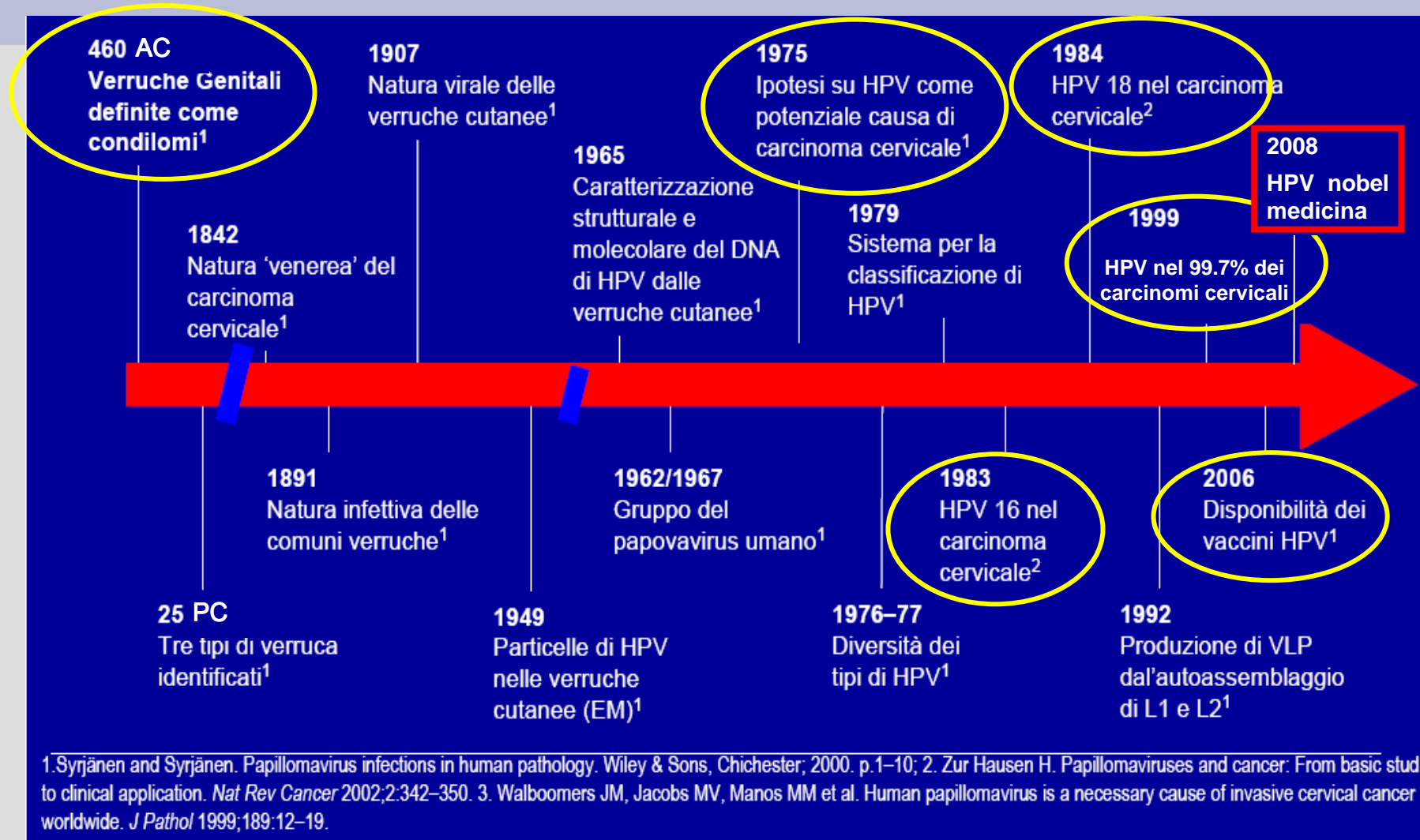
Laura De Marco

***Centro Unificato per lo Screening Cervico Vaginale
A.O. Città della Salute e della Scienza di Torino
Presidio S. Giovanni Antica Sede***

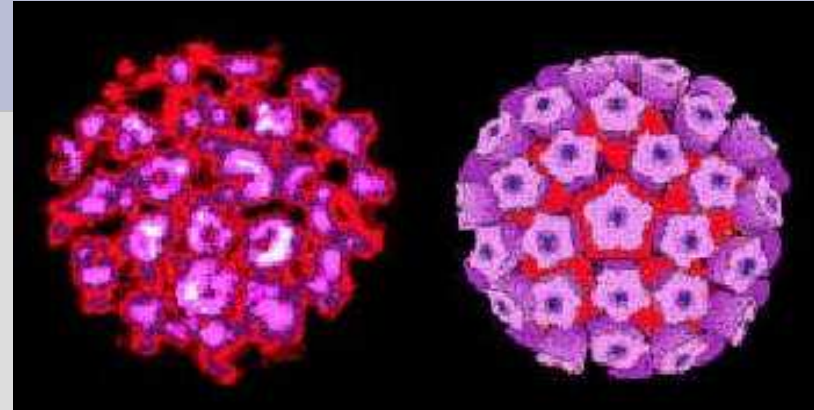
***Epidemiologia dei Tumori - Università di Torino
Laboratorio Epidemiologia Molecolare - CeRMS***



HPV: MILESTONES NELLA RICERCA



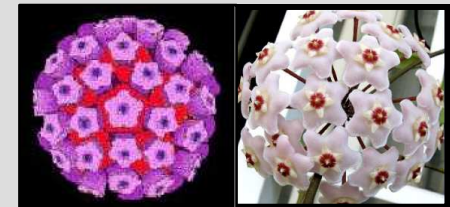
CHE COS'È IL PAPILOMA VIRUS?



- Famiglia : *Papillomaviridae*; Genere: Papillomavirus
- Piccoli virus nudi a simmetria icosaedrica
- DNA doppia elica di circa 8000 bp → geni L e E
- Capside icosaedrico diametro 52 – 55 nm
- Specie specifici
- Tropismo per cellule epiteliali
- Virus oncogeni

Syrjänen and Syrjänen. Papillomavirus infections in human pathology. Wiley & Sons 2000, Chichester:11–46.

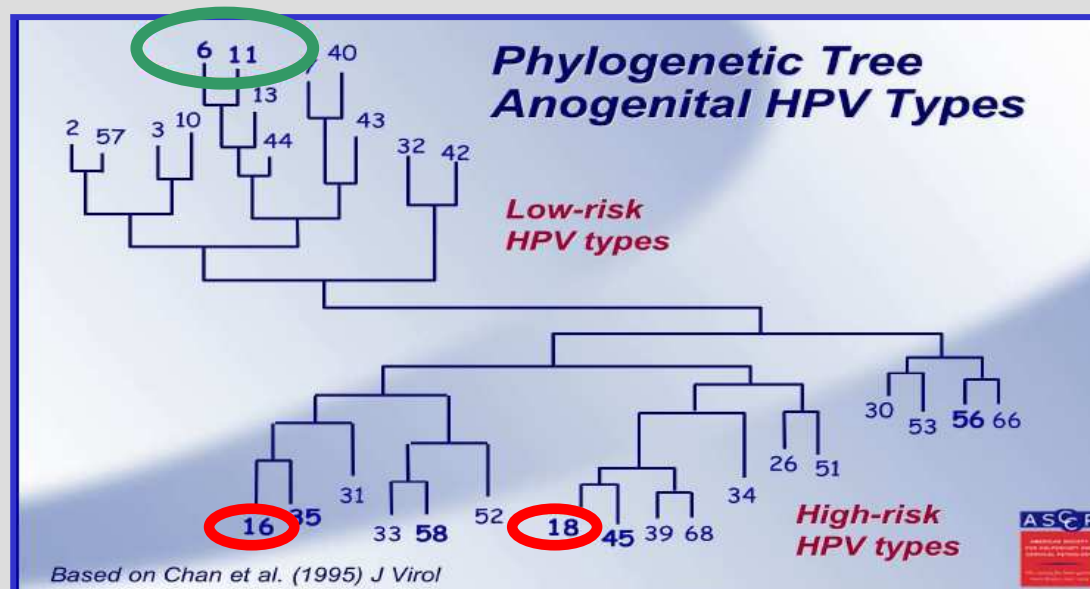
***TUTTI GLI HPV SONO
ONCOGENICI?***



HPV: CLASSIFICAZIONE

■ HPV possono infettare cellule epiteliali basali della cute o lo strato esterno dei tessuti e sono quindi classificati in:

- ◆ **Tipi cutanei:** epidermotropi → cute delle mani e dei piedi
- ◆ **Tipi mucosali:** mucosa orale, gola apparato respiratorio ed epitelio anogenitale



■ Più di 120 tipi di HPV sono stati identificati

- ◆ 40 sono mucosali, 15 sono stati classificati come oncogenici

HPV GENITALI E RISCHIO ONCOGENICO

Group	HPV types	Comments
Alpha HPV types		
1	16	Most potent HPV type, known to cause cancer at several sites
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Sufficient evidence for cervical cancer
2A	68	Limited evidence in humans and strong mechanistic evidence for cervical cancer
2B	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	Limited evidence in humans for cervical cancer
2B	30, 34, 69, 85, 97	Classified by phylogenetic analogy to HPV types with sufficient or limited evidence in humans
3	6, 11	..
Beta HPV types		
2B	5 and 8	Limited evidence for skin cancer in patients with epidermodysplasia verruciformis
3	Other beta and gamma types	..

Table 2: Human papillomavirus (HPV) types assessed by the IARC Monograph Working Group

HPV 6, 11: - 90% dei condilomi genitali
 - Lesioni cervicali CIN 1 (da 4 a 25%)

HPV 16, 18: - 70% dei carcinomi genitali
 - 70% di CIN 2 e 3
 - 70% Ca. vulvari, penieni, anali
 - 25% CIN1

ATT.: la presenza di HPV ad alto rischio è necessaria, ma non sufficiente per l'insorgenza di un carcinoma

Lancet Oncol. 10:321–322.



COME SI TRASMETTE L'INFEZIONE DA HPV?

HPV resistente al calore ed all'essiccamento (*Burd, 2003*)

Contatto sessuale

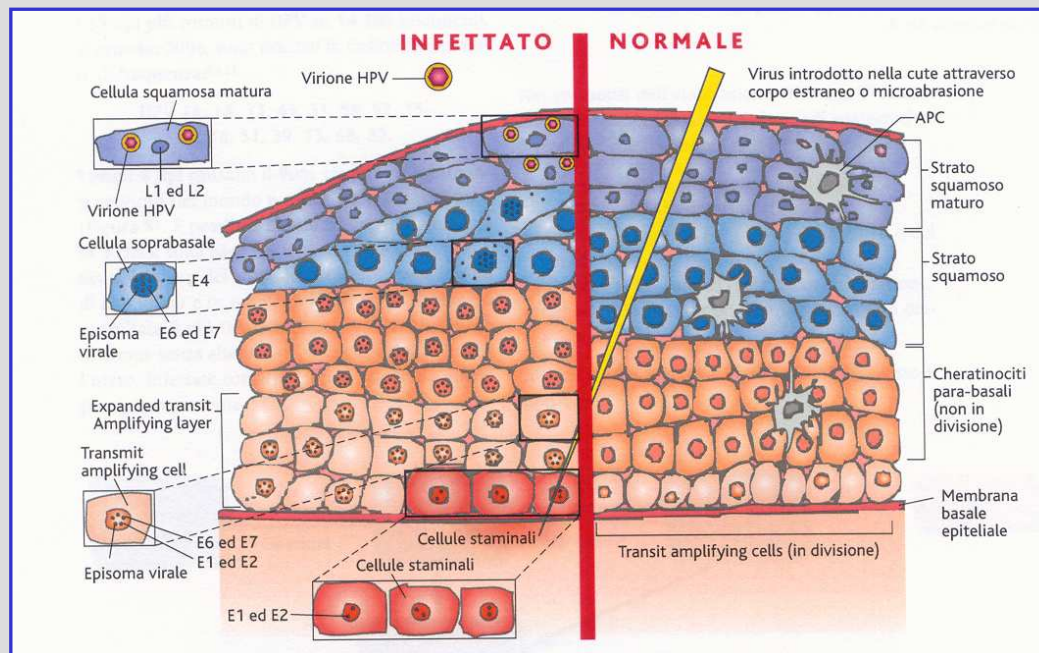
- Rapporti sessuali
- Genitale-genitale, manuale-genitale, orale-genitale
- La trasmissione può avvenire anche tramite contatto cutaneo nell'area genitale

IL PRESERVATIVO PROTEGGE DALL'INFEZIONE?

- Il preservativo può ridurre il rischio di trasmissione, ma non è completamente protettivo.

HPV: COME "INFETTA" E COME SI REPLICA?

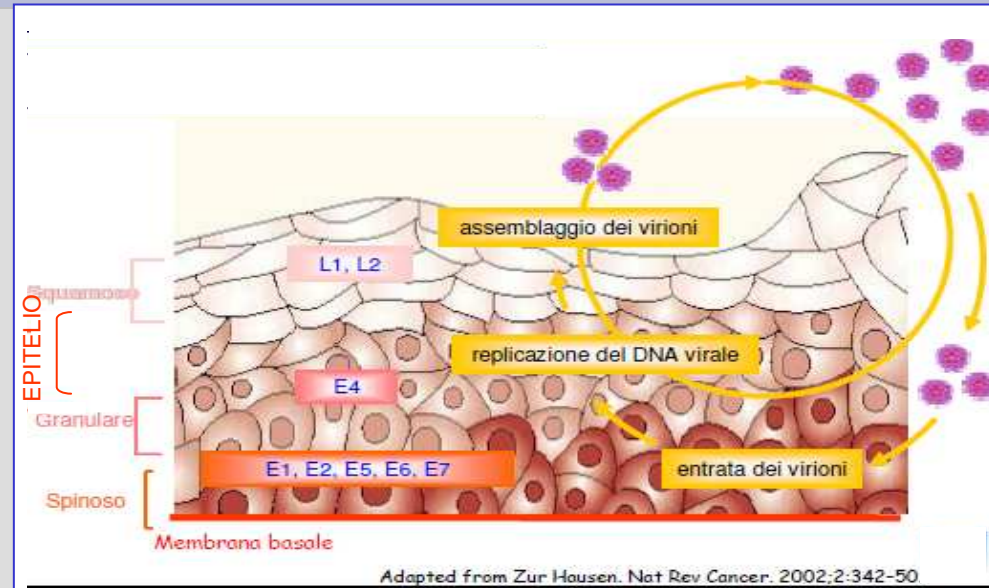
L'infezione non produce viremia, l'HPV resta localizzato a livello epiteliale e mucosale



- penetra nell'epitelio attraverso microabrasioni e raggiunge, infettando, le cellule dello strato basale.
- HPV si replica all'interno dell'epitelio squamoso stratificato
- è in grado di sfruttare la differenziazione cellulare per regolare la propria replicazione.

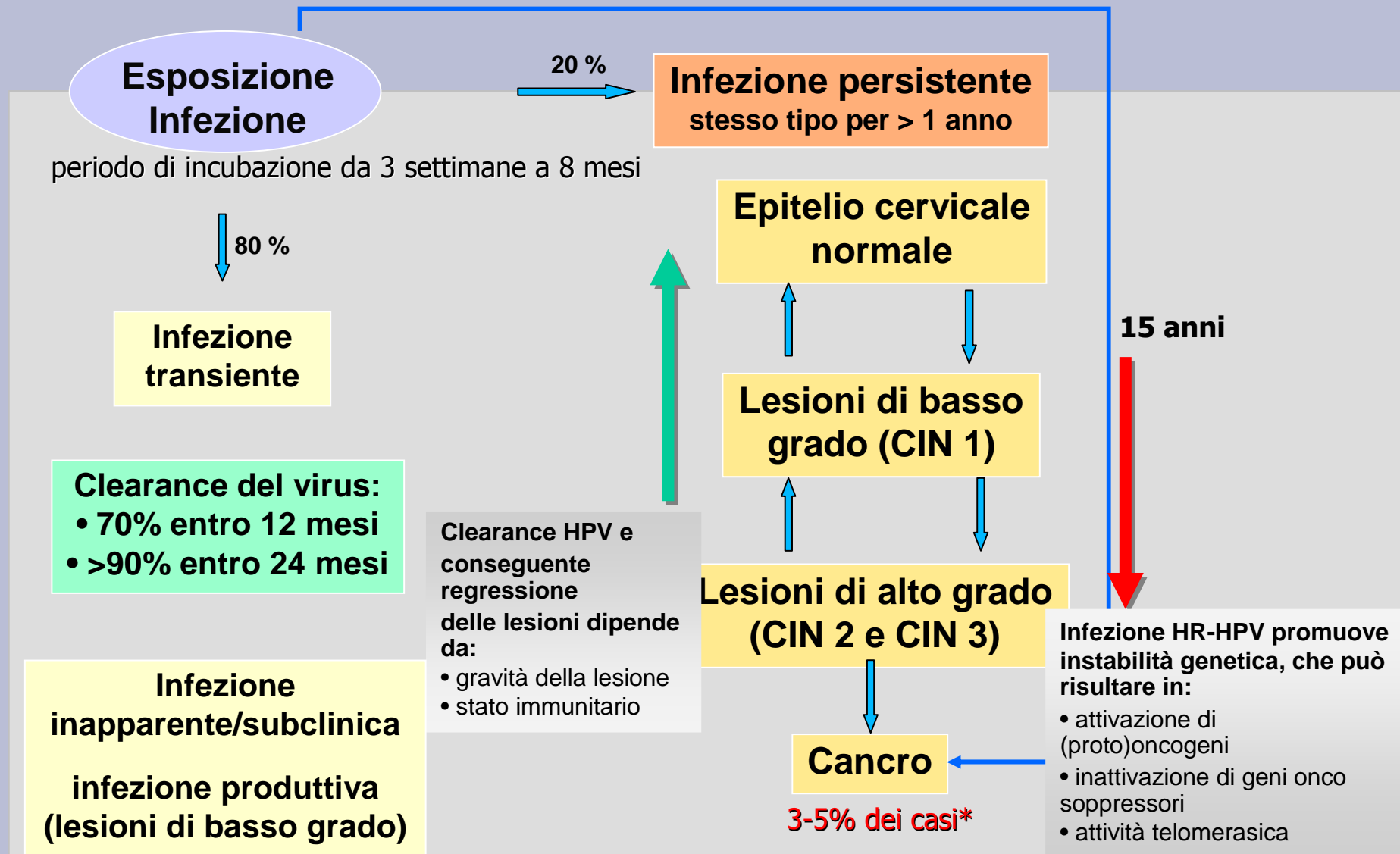
HPV: CICLO REPLICATIVO ed ESPRESSIONI GENICHE

L'infezione avviene attraverso lo strato basale



- Il virus può rimanere silente in forma episomale all'interno della cellula ospite questo può spiegare le recidive e anche la fluttuazione nel tempo della presenza di HPV DNA nei tessuti.
- Può replicarsi e indurre la proliferazione dell'epitelio squamoso → forme vegetanti (condilomi).
- Può integrarsi nel genoma della cellula inducendo con maggior frequenza lesioni di grado elevato.

CHE COSA PROVOCA L'INFEZIONE DA hrHPV?



da: Meijer CJL, 2000 modificato, * Meijer CJL, 2009

CHE COSA PROVOCA L'INFEZIONE DA hrHPV?

COSA RICORDARE

1. molti guariscono dall'infezione

2. tempi necessari per la progressione molto lunghi:

- displasia lieve → CIS: 4 – 7 anni
- CIS → carcinoma invasivo: quasi 10 anni

Tali tempi consentono l'identificazione delle lesioni precancerose nelle donne che partecipano regolarmente ai programmi di screening.

3. sviluppo di un tumore può essere un processo lento

- non tutti i passaggi sono necessariamente irreversibili
- la regressione appare essere l'evenienza predominante

IL CANCRO DEL COLLO DELL'UTERO È UN ESITO RARO DI UN'INFEZIONE COMUNE !!

FATTORI DI RISCHIO per la PERSISTENZA e PROGRESSIONE al TUMORE:

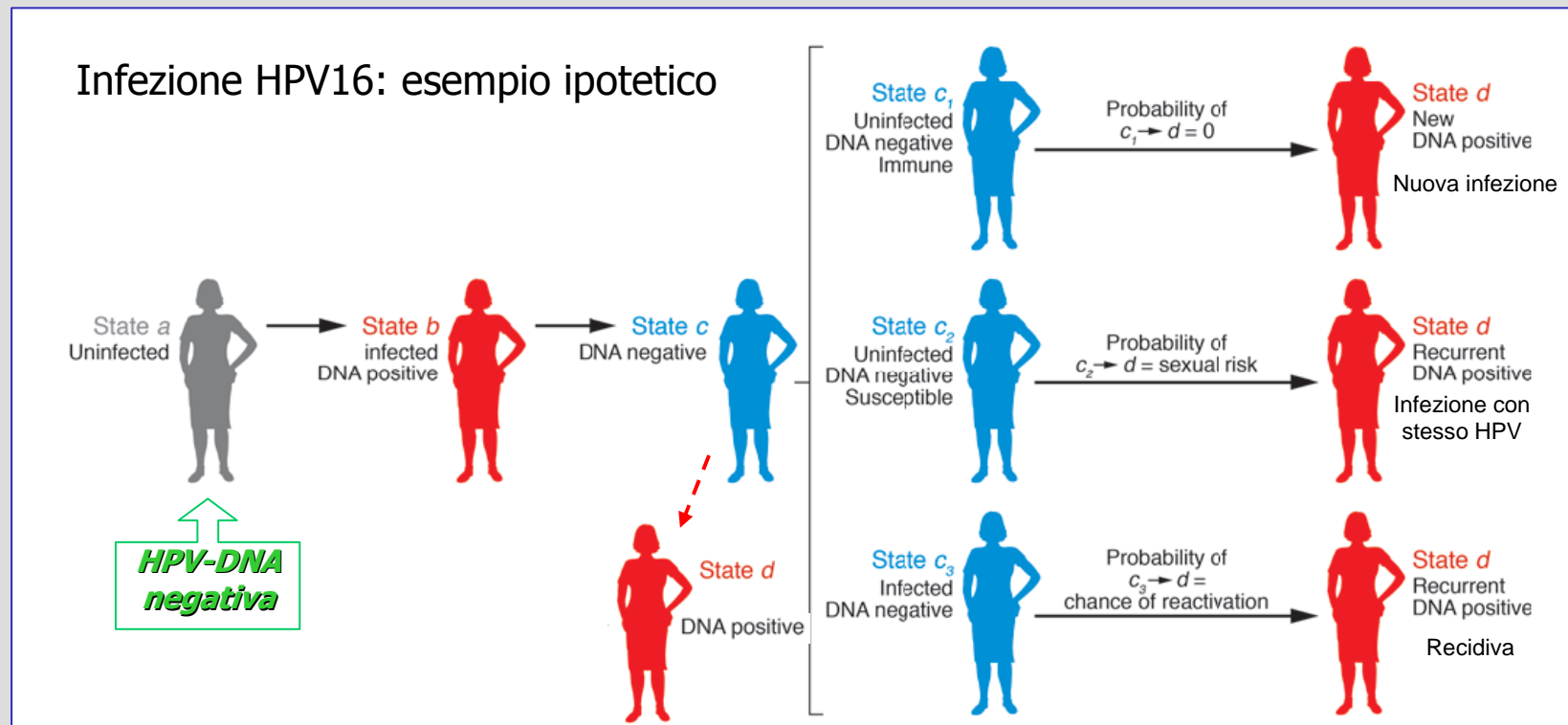
- **HR-HPV persistente**
- **Screening per tumore cervicale: mai o raramente**
- Immunosoppressione
- Fumo
- Uso di contraccettivi orali per lungo tempo
- Co-infezioni (Chlamydia trachomatis e HSV type 2)
- Numero di gravidanze
- Dieta

HPV: DOMANDE APERTE



- Dopo un'infezione gli anticorpi formati proteggono da una nuova infezione da HPV dello stesso genotipo?***
- Dopo un'infezione, essere HPV negative vuol dire aver eliminato il virus (clearance) o il virus è latente?***

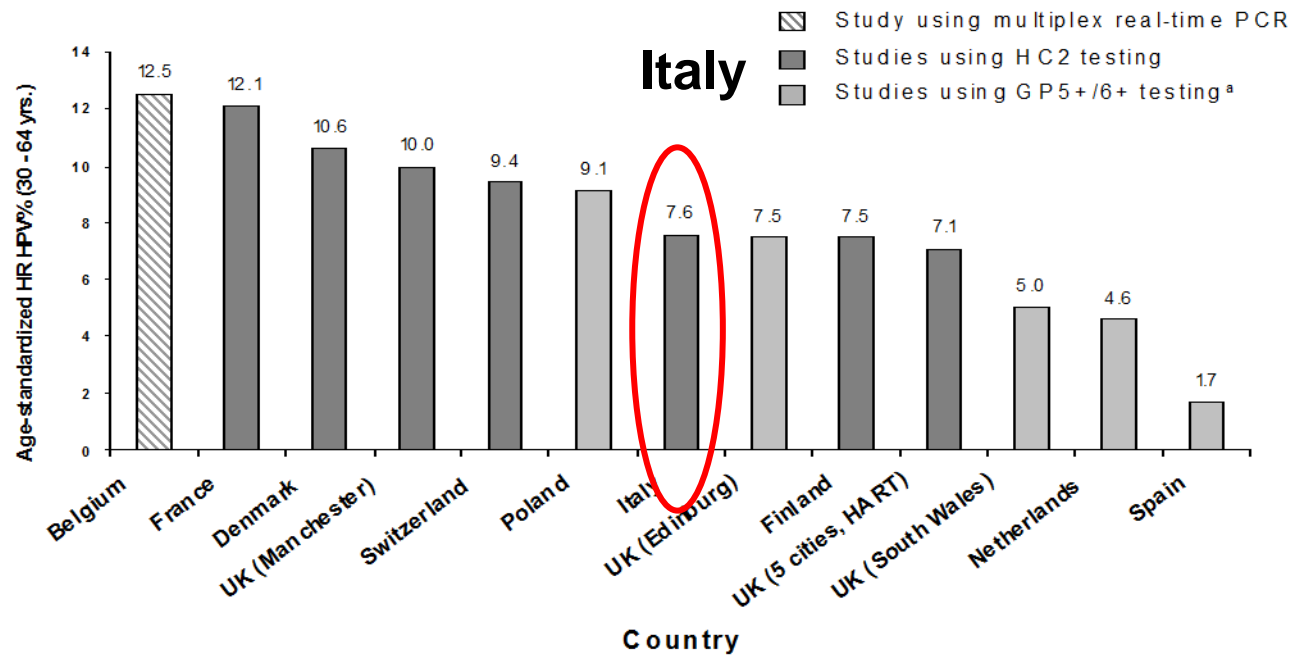
DOPO UN TEST NEGATIVO SI PUO' AVERE UN TEST POSITIVO?



da Gravitt PE, *The Journal of Clinical Investigation*, 2011- modificata

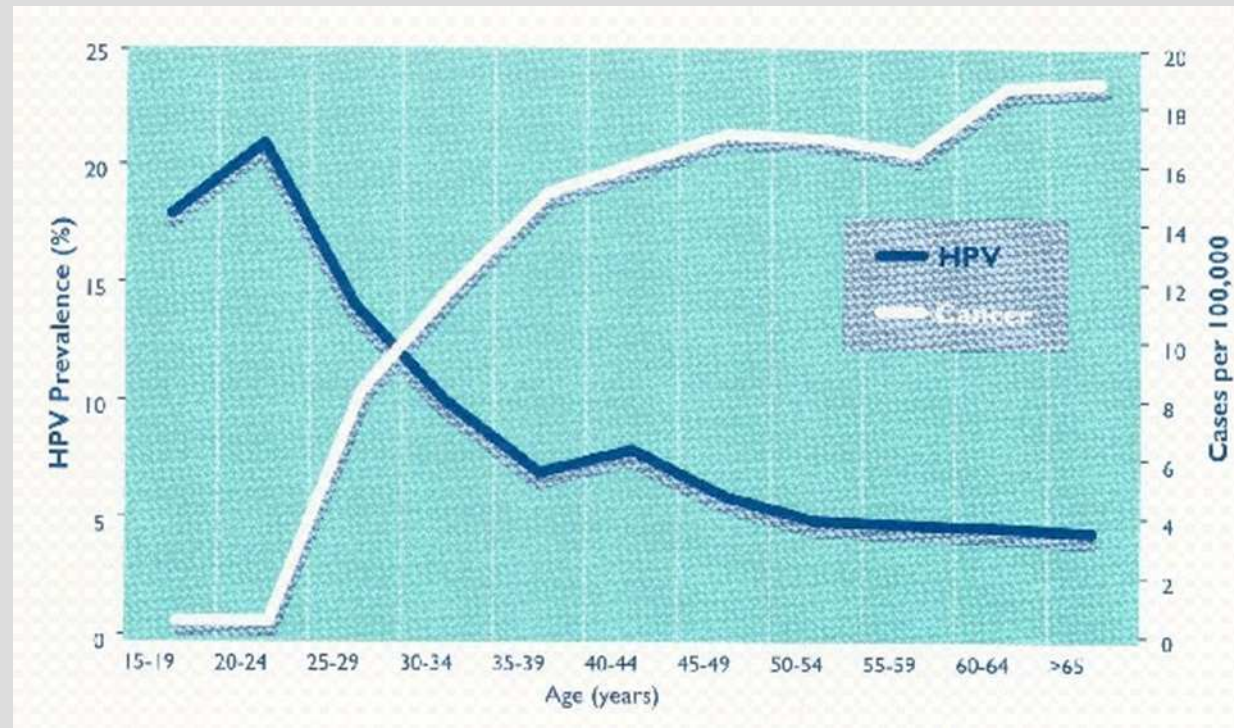
QUANTO FREQUENTE È L'INFEZIONE DA HPV?

**Infezione a trasmissione sessuale più frequente:
75% della popolazione attiva sessualmente è stata
infettata da HPV**



HPV: PREVALENZA DELLE INFEZIONI

- Correlata al **numero** e alla **frequenza** dei partner
- Correlata all'età (massima tra i 15 e i 25 anni)



HPV : EPIDEMIOLOGIA CARCINOMA CERVICALE

- Il carcinoma della cervice è il **terzo** tumore più frequente e la **quarta causa di morte** nel mondo per tumore tra le donne (*Arbyn 2011*)
- **~1.000.000 nuovi casi** di carcinoma della cervice uterina ogni anno nel mondo (*Arbyn 2011*)
- e un tasso di mortalità variabile in base all'area geografica da <3 a >55 / 100.000 (*Arbyn 2011*)
- Il **80%** dei nuovi casi e delle morti colpiscono donne che vivono nei paesi in via di sviluppo

HPV : EPIDEMIOLOGIA CARCINOMA CERVICALE

JOURNAL OF PATHOLOGY
J. Pathol. 189: 12-19 (1999)

HUMAN PAPILLOMAVIRUS IS A NECESSARY CAUSE OF INVASIVE CERVICAL CANCER WORLDWIDE

JAN M. M. WALBOOMERS^{1*}, MARCEL V. JACOBS¹, M. MICHELE MANOS², F. XAVIER BOSCH³, J. ALAIN KUMMER¹, KIERTI V. SHAH², PETER J. F. SNIJDERS¹, JULIAN PETO⁴, CHRIS J. L. M. MEIJER¹ AND NUBIA MUÑOZ⁵

¹Department of Pathology, University Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands

²Department of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, U.S.A.

³Institute Catala d'Oncologia, Barcelona, Spain

⁴Institute of Cancer Research, Belmont, Surrey, U.K.

⁵Unit of Field and Intervention Studies, IARC, Lyon, France

- Prevalenza del **99.7%** di DNA di HPV nei carcinomi della cervice (in PCR) (*Walboomers, 1999; Meijer, 2000*)
- Il **50-55%** dei carcinomi della cervice correlati ad HPV sono **associati al 16**, il **15-20% al 18**, il 9% al 45, il 6% al 31 e il 3% al 33 (*IARC, 2000; Meijer, 2009*)

STRATEGIE DI PREVENZIONE DEL CARCINOMA CERVICALE

SCREENING DI MASSA

OBIETTIVO

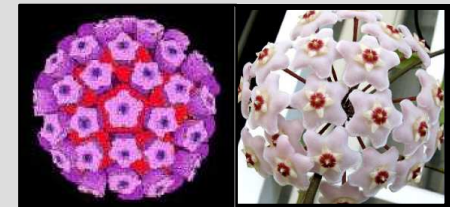
- identificare e trattare le lesioni precancerose
- Prevenire i trattamenti non necessari
- Minimizzare i costi

VACCINAZIONE

PREVENZIONE DEL TUMORE CERVICALE: APPROCCI NEI PAESI SVILUPPATI

- Screening
 - Citologia con colorazione di Papanicolaou (Pap-Test)
 - HPV test
- Valutazione di secondo livello delle donne positive:
 - colposcopia o biopsia cervicale
- Trattamento delle donne con diagnosi istologica di alto grado

COME SI FA LA DIAGNOSI DELL' INFEZIONE?



SISTEMI INDIRECTI

- Indagine clinica e colposcopica
- Esame microscopico:

PAP-TEST (cellule esfoliate)

COILOCITI

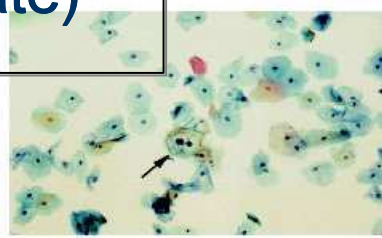


FIG. 4. ThinPrep Pap Smear showing abnormal squamous cells with HPV cytopathic effect (arrow), consistent with LSIL.

tessuto bioptico

Cellule con grossi vacuoli perinucleari e addensamento di citoplasma → patognomoniche

- Indagine microscopica di preparati istologici
- Microscopia elettronica

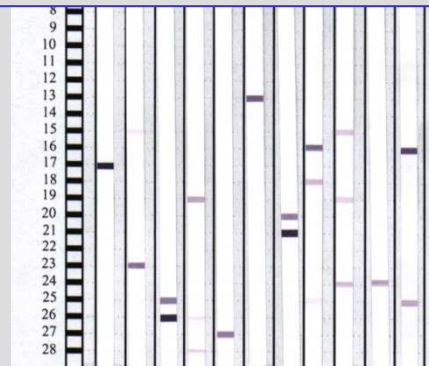
SISTEMI MOLECOLARI - DIRETTI

Esistono 3 sistemi utilizzabili per la valutazione della presenza di HPV in un campione biologico

Ibridazione con sonde



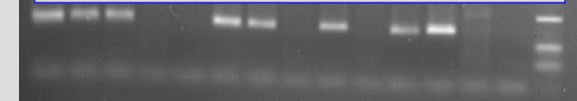
Identificazione di HPV DNA H-L rischio
Genotipizzazione



PCR



Identificazione di HPV DNA
Quantificazione di HPV DNA
Quantificazione di HPV mRNA



Amplificazione del segnale



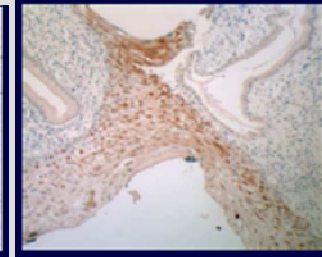
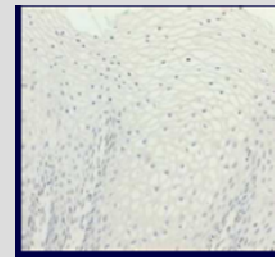
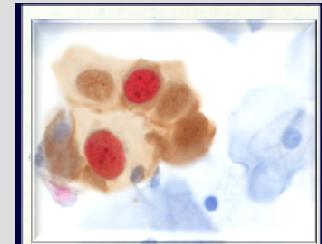
Identificazione di HPV DNA



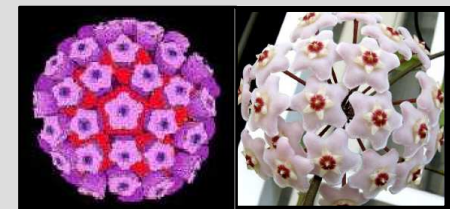
HPV: DIAGNOSI DI INFEZIONE

Nuovi tests molecolari ed immunologici

- Persistenza di HPV
- Viral load/real time PCR
- mRNA E6/E7 di HPV ad alto rischio
- HPV integrazione / delezione HPV E2
- HPV subtyping, sequenziamento regione E6
- Marcatori tumorali:
 - p16/INK4a, DNA methylation
- Risposta immune anti HPV:
 - IgG. IgA

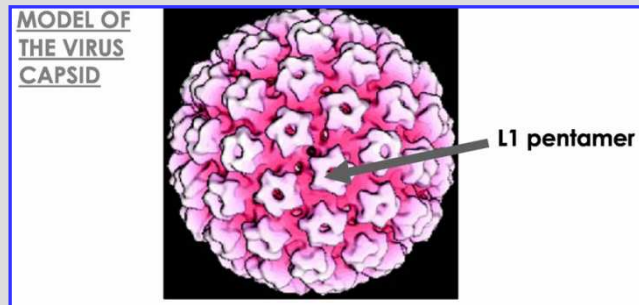


PREVENZIONE DEL TUMORE CERVICALE : VACCINI

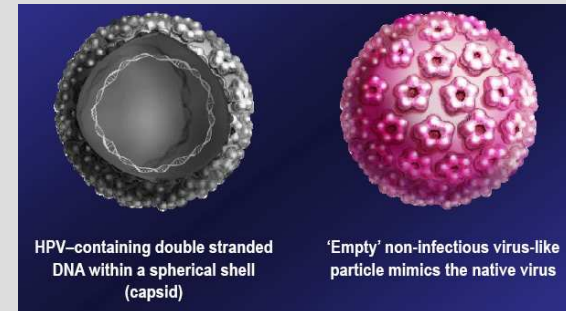
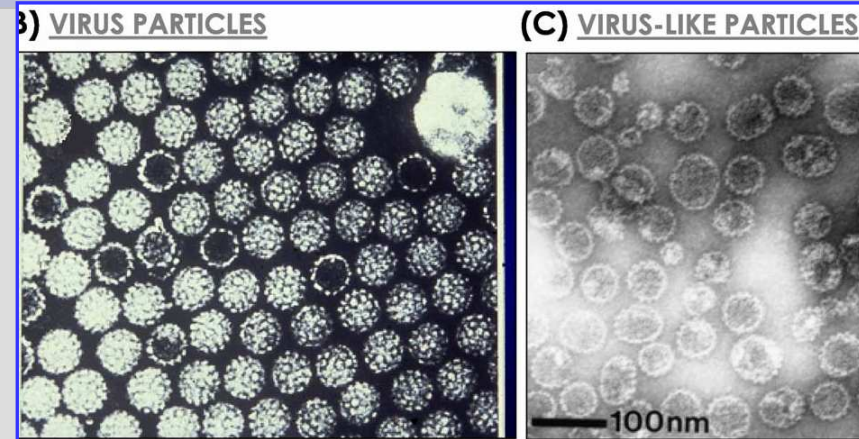


COMPOSIZIONE DEI VACCINI HPV

particelle simil-virali ("Virus-like Particles", o VLP) + Adjuvanti



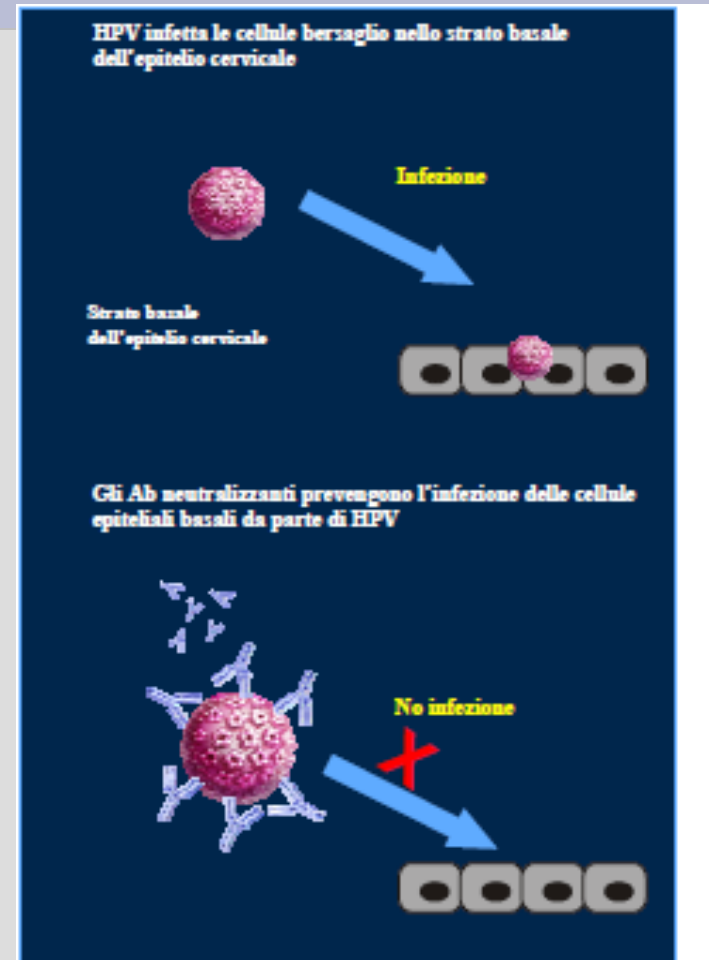
M. Stanley et al. / Vaccine 24S3 (2006) S3/106–S3/113



Ad oggi sono disponibili due vaccini in grado di prevenire l'infezione da HPV; entrambi sono costituiti da proteine capsidiche L1 e da un adiuvante.

VACCINI PREVENTIVI CONTRO HPV

- L1 ha più alto potere immunogenico con produzione di anticorpi HPV specifici nell'ospite
- La vaccinazione previene l'infezione mediante l'induzione alla produzione di anticorpi neutralizzanti
- Gli anticorpi neutralizzanti si legano a siti presenti sul capside virale e prevengono l'infezione della cellula ospite¹



1. Stanley M *et al.* *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S106-S113;
2. WHO Department of Immunization, Vaccines and Biologicals 2007.

VACCINI PREVENTIVI CONTRO HPV

Cervarix (Glaxo SmithKline)

- Bivalente (tipi 16/18)
- Via intra muscolo in 3 dosi (0, 1 e 6 mesi)
- VLPs prodotte in cellule di insetto (*Trichoplusia ni*) con vettore Baculovirus
- Adjuvante: AS04 (idrossido di alluminio e MPL®)
- Autorizzato per l'uso (EMA), registrato in Italia

Gardasil (Sanofi Pasteur MSD/Merck)

- Quadrivalente (16/18/6/11)
- Via intra muscolo in 3 dosi (0, 2 e 6 mesi)
- VLPs prodotte in cellule di *S. cerevisiae*
- Adjuvante: alluminio idrossifosfato solfato amorfo (AAHS)
- Autorizzato per l'uso (FDA, EMA), registrato in Italia

VACCINI PREVENTIVI CONTRO HPV

SCOPO

- prevenzione di circa:
 - 70% di tutte le CIN 2/3 e dei casi di cancro cervicale (bivalente-quadrivalente)
 - 90% di tutti i condilomi (quadrivalente)
 - 35-50% circa di tutti i casi di CIN 1
- efficacia del vaccino valutata in clinical trials (fase II e III) coinvolgendo donne tra i 16-26 anni

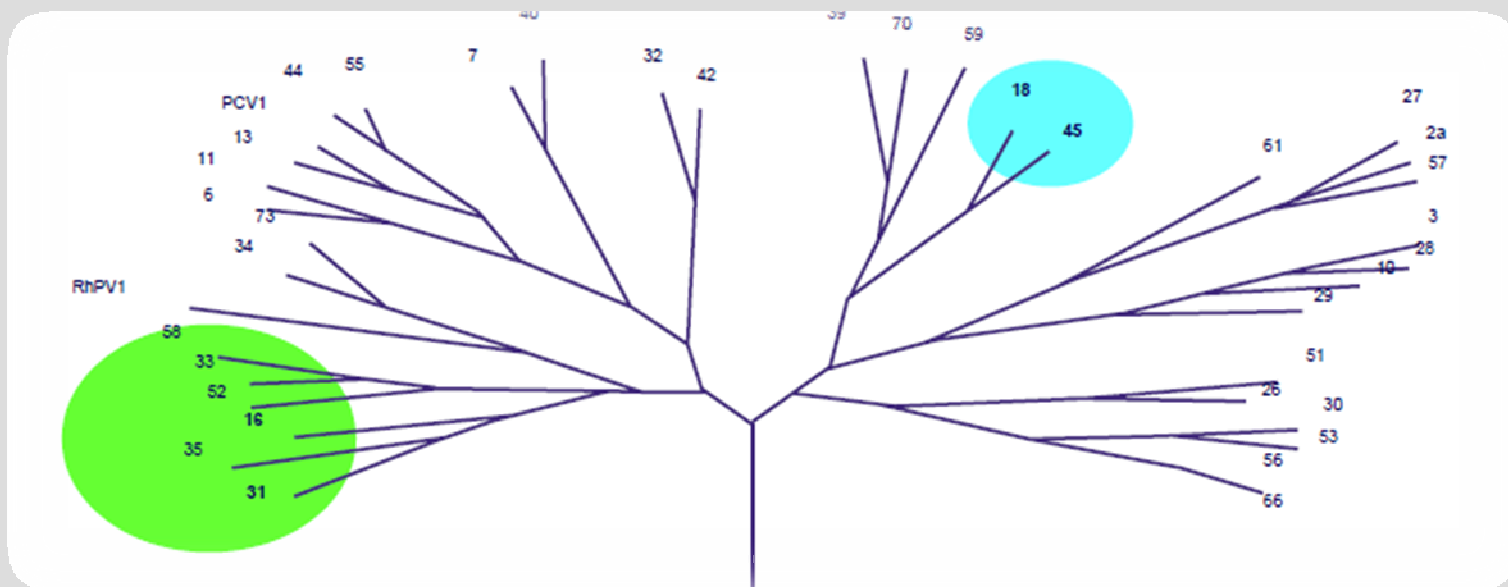
RISULTATI SPERIMENTALI

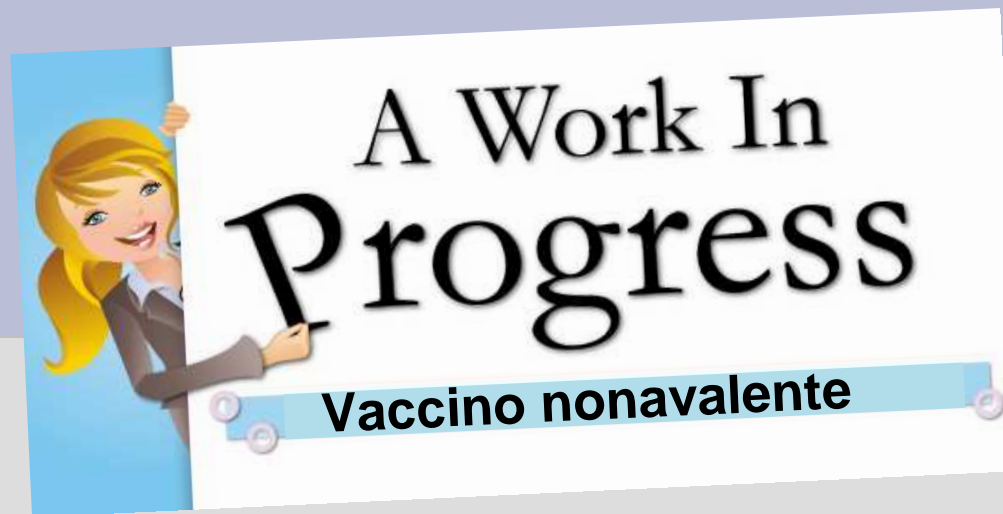
- Buona risposta anticorpale, consistentemente più alta dell'immunità naturale
- Buona protezione contro le nuove infezioni con i tipi di HPV presenti nel vaccino (~100%)
- Prevenzione delle lesioni cervicali
- No eradicazione dell'infezione
- Cross protezione verso altri tipi di HPV (*Malagon T, Lancet Inf Dis 2012*):
 - HPV 31, 33, 45, 52, 58

I RISCHI DA EVITARE

- ✓ Falsa sicurezza verso altre infezioni sessualmente trasmesse
- ✓ Minore adesione allo screening → *partecipazione anche se vaccinate*

RISULTATI SPERIMENTALI





- Copertura per 9 tipi di HPV:

16/18/6/11 + 31,33,45,52,58

SCOPO:

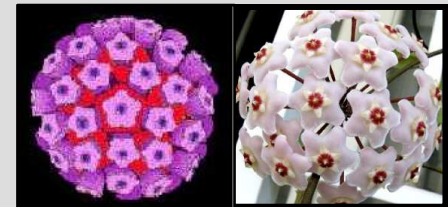
- potenziale di prevenzione del 90%



20% in più del quadrivalente

- Studi di valutazione costo/efficacia quadri. vs nonavalente pubblicati
(Drolet M. *Int. J Cancer*, 2013)

HPV-DNA: IL TEST MOLECOLARE



Test Hybrid Capture ® 2 (HC2) - Qiagen

CHE COS' E'?

- ✓ **HYBRID CAPTURE** e' una tecnologia a segnale amplificato, basata sulla rilevazione dell'acido nucleico tramite chemiluminescenza
- ✓ il test **HYBRID CAPTURE 2** e' stato per anni l'unico test di rilevazione di HPV-DNA approvato dalla **FDA**
- ✓ il test **HYBRID CAPTURE 2** ha conseguito il marchio **CE, IVD**

- ✓ metodo qualitativo
- ✓ **13 (12 + 1)** ceppi ad alto rischio oncogenico

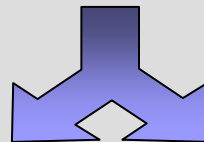
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68

Test Hybrid Capture ® 2 (HC2) - Qiagen

**IL SISTEMA HC2 E' STANDARDIZZATO
PER LE SEGUENTI TIPOLOGIE di PRELIEVO
con RELATIVE SOLUZIONI DI TRASPORTO**



ThinPrep



STM (Specimen Transport Medium)

TAKE HOME MESSAGES

HPV è un'infezione,
non una malattia
ed è molto comune (1/2)

Essere HPV positive
non vuol dire essere
"malate"

La maggior parte
delle infezioni hr HPV
si risolve spontaneamente
in 6-18 mesi

Il vaccino è solo profilattico,
non è efficace in chi ha già
il virus
o lesioni associate

Il carcinoma è un
esito raro per
un'infezione comune



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!!!

Hoya carnosa: pianta rampicante della famiglia delle **Asclepiadaceae**. Spesso i fiori vengono chiamati fiori di cera o fiori di porcellana.