

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL XII – OBSTETRICĂ ȘI GINECOLOGIE**

FLOCA CRISTINA-ANAMARIA



TEZĂ DE DOCTORAT

**NOI TENDINȚE ÎN DETECȚIA LEZIUNILOR
PRECANCEROSE ȘI STADIILOR INCIPIENTE
ALE CANCERULUI DE COL UTERIN
LA PACIENTELE SUB 30 DE ANI**

- REZUMAT -

Coordonator științific
PROF. UNIV. DR. PIRTEA LAURENȚIU

**Timișoara
2023**

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE	VI
LISTA ABREVIERILOR ȘI SIMBOLULOR	VII
LISTA FIGURILOR	X
LISTA TABELELOR	XII
MULȚUMIRI	XIV
INTRODUCERE	1
 PARTEA GENERALĂ	 5
CAPITOLUL 1..... CONSIDERAȚII ȘTIINȚIFICE PRIVIND CANCERUL DE COL UTERIN	5
1.1. INCIDENTA, PREVALENȚA ȘI FACTORI DE RISC PENTRU CANCERUL DE COL UTERIN	5
1.2. CONSIDERAȚII ANATOMICE	6
1.3. PATOGENEZA ȘI CLASIFICAREA HISTOLOGICĂ A CANCERULUI DE COL UTERIN	7
CAPITOLUL 2. EVALUARE ȘI DIAGNOSTIC	11
2.1. DIAGNOSTICUL LEZIUNILOR PREINVAZIVE	11
2.1.1. SCREENING-UL CANCERULUI DE COL UTERIN	11
2.1.2. CITOLOGIE CERVICALĂ	13
2.1.3. GENOTIPAREA HPV	16
2.1.4. COLPOSCOPIA	19
2.1.5. DUAL-STAINING P16/KI-67	20
2.2. DIAGNOSTICUL HISTOPATOLOGIC AL CANCERULUI DE COL UTERIN ȘI AL LEZIUNILOR PREINVAZIVE DE COL UTERIN	21
2.2.1. METODE DE PRELEVARE	21
2.2.2. CONIZIA CERVICALĂ	22
CAPITOLUL 3. STADIALIZAREA CANCERULUI DE COL UTERIN	24
CAPITOLUL 4. MANAGEMENTUL LEZIUNILOR PRECURSOARE	27
4.1. GHIDURI ACTUALE PENTRU MANAGEMENTUL LEZIUNILOR PRECURSOARE	27
4.2. COMPORTAMENT AJUVANT LA FEMEILE CU INFECȚIE GENITALĂ PERSISTENTĂ HPV	30
CAPITOLUL 5. PREVENȚIA PRIMARĂ A CANCERULUI DE COL UTERIN PRIN VACCINAREA HPV.....	31

PARTEA SPECIALĂ	33
CAPITOLUL 1. MOTIVAȚIA CERCETĂRII.....	33
1.1. PROIECTAREA CERCETĂRII STUDIILOR CLINICE	34
1.1.1. DESIGNUL STUDIILOR	34
1.1.2. POPULAȚIA STUDIATĂ	34
1.1.3. CONTEXTUL DE LUCRU	34
1.1.4. OBIECTIVE GENERALE	35
1.1.5. OBIECTIVE SPECIFICE	35
1.1.6. PARAMETRI STUDIATI	36
1.2. MATERIALE ȘI METODE.....	37
1.2.1. SELECȚIA PACIENTELOR	37
1.2.2. CRITERII DE INCLUDERE/EXCLUDERE	37
1.2.3. COLECTAREA DATELOR	38
1.2.4. ANALIZA STATISTICĂ	38
1.2.5. FINANȚAREA	39
1.2.6. DECLARAȚIA COMISIEI DE EVALUAREA INSTITUȚIONALĂ	39
CAPITOLUL 2. REZULTATE	40
2.1. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: STUDIUL ACURATEȚEI DUBLEI TESTĂRI (DUAL-STAINING) P16/KI-67 COMPARATIV CU TESTAREA PAPILLOMA VIRUSULUI UMAN (HPV) LA FEMEILE CU CITOLOGIE ANORMALĂ SUB 30 DE ANI (34)	40
2.1.1. CONTEXTUL ȘTIINȚIFIC ACTUAL	40
2.1.2. OBIECTIVELE CERCETĂRII	41
2.1.3.1. Designul studiului și selecția pacienților	41
2.1.3.2. Colectarea datelor	42
2.1.3.2.1. Citologie cervicală, colposcopie și biopsie	42
2.1.3.2.2. Testarea HPV	43
2.1.3.2.3. Dual staining p16/KI-67	44
2.1.4. ANALIZA STATISTICĂ	44
2.1.5. REZULTATE	44
2.1.6. DISCUȚII	48
2.1.7. CONCLUZII	50
2.2. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: STUDIUL ROLULUI DUAL-STAINING P16/KI-67 ÎN MANAGEMENTUL PACIENTELOR SUB 30 DE ANI CU ASC- US/L-SIL (36)	55
2.2.1. CONTEXTUL ȘTIINȚIFIC ACTUAL ȘI OBIECTIVELE	55
2.2.2. MATERIALE ȘI METODE.....	57
2.2.2.1. Designul studiului și selecția pacienților	57
2.2.2.2. Colectarea datelor	57
2.2.2.2.1. Citologie cervicală, colposcopie și biopsie	57
2.2.2.2.2. Testarea HPV	58
2.2.2.2.3. Dual-staining p16/Ki-67	58
2.2.2.3. Analiza statistică	58
2.2.3. REZULTATE	59

2.2.3.1. Aspecte demografice	59
2.2.3.2. Colposcopia	59
2.2.3.3. Genotiparea HPV	61
2.2.3.4. Dual-staining p16/Ki-67	62
2.2.3.5. Histopatologie	63
2.2.4. DISCUȚII	67
2.2.4.1. Screening pentru cancerul de col uterin prin citologie cervicală și co- testare	67
2.2.4.2. Vârsta și HPV.....	68
2.2.4.3. Testarea HR-HPV	69
2.2.4.4. Studii privind distribuția infecției cu HPV	69
2.2.4.5. Dual-staining p16/Ki-67.....	70
2.2.4.6. Triaajul femeilor HPV-pozitive cu citologie normală prin dual-staining p16/Ki-67	71
2.2.4.7. Impactul tratamentului excesiv	71
2.2.4.8. Persistența dual-staining pozitiv după conizație	72
2.2.4.9. Dual-staining în timpul sarcinii	72
2.2.5. CONCLUZII	73
2.3. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: NOI PERSPECTIVE ÎN DIAGNOSTICUL VARIANTELOR RARE DE ADENOCARCINOM ALE COLULUI UTERIN – PREZENTARE DE CAZ ȘI REVIEW AL LITERATURII (121).....	74
2.3.1. CONTEXTUL ȘTIINȚIFIC ACTUAL ȘI OBIECTIVELE	74
2.3.2. PREZENTARE DE CAZ	74
2.3.3. DISCUȚII ȘI REVIEW AL LITERATURII	88
2.3.3.1. Definiții	88
2.3.3.2. Prezentare	88
2.3.3.3. Incidență	88
2.3.3.4. Vârsta	88
2.3.3.5. Citologia cervicală	89
2.3.3.6. Genotiparea HPV	89
2.3.3.7. Patogeneza	89
2.3.3.8. Patologia	90
2.3.3.9. Studiu imunohistochimic	90
2.3.3.10. Prognostic	92
2.3.3.11. Abordarea chirurgicală minim invazivă sau deschisă	93
2.3.4. CONCLUZII	94
CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	95
REFERINȚE	101
ANEXE - ARTICOLE PUBLICATE ÎN EXTENSO	I

ABSTRACT

Principalul factor de risc pentru cancerul de col uterin este reprezentat de infecția persistentă cu tipurile HR-HPV (HPV cu risc crescut), iar tipurile 16 și 18 sunt responsabile pentru majoritatea cazurilor de cancer de col uterin (1). Mai multe studii au documentat sensibilitatea superioară a testării HR-HPV validate clinic față de citologia Papanicolau pentru detectarea leziunilor precursore și a cancerului de col uterin (2–4).

Testarea HR-HPV pentru triajul pentru colposcopie al pacientelor cu L-SIL s-a dovedit eficientă la femeile ≥ 30 de ani, dar nu este recomandată femeilor mai tinere din cauza ratelor pozitive ridicate de infecție HR-HPV (5). Co-testarea sau genotiparea HPV a devenit o recomandare standard în multe ghiduri internaționale, dar nu este recomandată pacientelor sub 30 de ani (6–10). Pe de altă parte, din cauza numărului mare de infecții tranzitorii cu HPV, în special la femeile tinere, specificitatea genotipării HPV ca metodă de screening pentru cancerul de col uterin este limitată.

Necesitatea unei metode mai bune de triaj a acestor cazuri, cu ASC-US și L-SIL, deschide oportunitatea testării imunohistochimice, care poate oferi elemente suplimentare pentru evaluarea severității afecțiunii. Tehnicile de imunohistochimie au fost deja folosite pentru suprastadializarea probelor de cancer de col uterin (11) sau pentru a evalua alte neoplasme ginecologice, cum ar fi cancerul ovarian sau endometrial.

Testarea imunohistochimică combinată a p16/Ki-67 poate fi utilizată pentru a detecta debutul oncogenezei în celulele cervicale. Supraexprimarea p16 este cauzată de creșterea activității oncoproteinei E7 (corelată cu infecția persistentă cu HPV), iar Ki-67 este un marker al proliferării tumorale. Testul este considerat pozitiv atunci când ambii markeri sunt exprimați în aceeași celulă. Testarea imunohistochimică combinată p16/Ki-67 poate fi efectuată pe proba de mediu lichid utilizată pentru testul Papanicolau și genotiparea HPV, dar și pe piesa de biopsie. Conform celor mai recente date din literatură, testarea imunohistochimică combinată are o sensibilitate comparabilă, dar o specificitate semnificativ mai mare în comparație cu testarea HPV (12–15).

Datele disponibile în literatură pentru triajul pacientelor cu ASC-US și L-SIL <30 de ani prin utilizarea dual-staining sunt insuficiente, majoritatea studiilor fiind retrospective și nu se adresează exclusiv acestui subgrup de paciente. Cel mai mare studiu de până acum care a raportat rezultate ale dual-staining prin trierea pacientelor în funcție de vârstă a fost realizat de Bergeron și colab. ca parte a studiului PALMS. Ei au raportat o sensibilitate crescută a dual-staining pentru detectarea CIN2+ pentru pacientele sub 30 de ani și o creștere semnificativă a valorilor predictive pozitive pentru detectarea CIN2+ în comparație cu genotiparea HPV. Ei au mai declarat că triajul cu dual-staining ar putea reduce considerabil numărul de recomandări pentru colposcopie (16,17).

Faptul că aceeași probă de mediu lichid poate fi utilizată pentru citologia cervicală, genotiparea HPV și imunocitochimie simplifică procedura, prin faptul că pacienta nu este obligată să mai facă o vizită la specialist pentru efectuarea testului.

Aceasta înseamnă că dual-staining p16/Ki-67 ar putea fi oferită ca „test reflex” pentru pacientele cu anomalii citologice la citologia cervicală în mediu lichid sau pentru pacientele cu tulpini HPV cu risc crescut detectate la genotiparea HPV.

MOTIVAȚIA CERCETĂRII

Deși numeroase studii retrospective au arătat acuratețea dual-staining p16/Ki-67 în detectarea CIN2+, sunt necesare mai multe date pentru a valida utilizarea dual-staining p16/Ki-67 ca parte a unui algoritm de management pentru pacientele cu rezultate citologice anormale la testul Papanicolau.

În studiile noastre, ne-am propus să actualizăm dovezile actuale cu privire la acuratețea colorării p16 și a dual-staining cu p16 și Ki-67 pentru detectarea CIN2+ în triajul pacientelor cu ASC-US sau L-SIL sub 30 de ani. În ciuda multor date disponibile până în prezent cu privire la specificitatea îmbunătățită a dual-staining la femeile tinere cu ASC-US sau L-SIL în comparație cu genotiparea HPV, din cunoștințele noastre, acesta este primul studiu prospectiv efectuat până acum pentru acest grup specific de paciente.

Rezultatele prefigurate ale studiului urmăresc să îmbogățească datele disponibile până în prezent în literatură și să îmbunătățească protocolul de management pentru pacientele cu vârsta sub 30 de ani cu anomalii citologice pe frotiul Papanicolau.

Această cercetare și-a propus să răspundă la următoarele întrebări:

- Ar putea dual-staining p16/Ki-67 să aibă un rol relevant în triajul pentru biopsie al pacientelor cu ASC-US/L-SIL?
- Este util dual-staining p16/Ki-67 la subgrupul de paciente sub 30 de ani?
- Care test sau combinație de teste are cea mai mare precizie pentru detectarea CIN2+?
- Ar putea fi utilizat dual-staining p16/Ki-67 în screening-ul variantelor rare de adenocarcinom de col uterin?

Prima parte a cercetării: Contribuția personală „Studiul acurateței dublei testări (dual-staining) p16/ki-67 comparativ cu testarea papilloma virusului uman (HPV) la femeile cu citologie anormală sub 30 de ani” a analizat utilitatea p16/Ki-67 în triajul pentru biopsie al pacientelor cu ASC-US sau L-SIL.

A doua parte a cercetării: Contribuția personală „Studiul rolului dual-staining p16/ki-67 în managementul pacientelor sub 30 de ani cu ASC-US/L-SIL” analizează sensibilitatea și specificitatea pentru CIN2+ confirmat prin biopsie a HR-HPV, dual-staining p16/Ki-67, colposcopie și combinații ale testelor la toate pacientele și separat pentru grupurile ASC-US și L-SIL.

A treia parte a cercetării: Contribuția personală „Noi perspective în diagnosticul variantelor rare de adenocarcinom ale colului uterin – prezentare de caz și review al literaturii” reprezintă un raport de caz detaliat al unei paciente tinere cu o variantă rară de adenocarcinom de col uterin, p16/Ki-67 pozitiv, HPV negativ, și include o revizuire extinsă a literaturii de specialitate pe acest subiect.

Pentru primul studiu au fost selectate din baza de date pacientele eligibile care au fost supuse colposcopiei în cadrul Secției de Obstetrică și Ginecologie a Spitalului Municipal Timișoara, în perioada ianuarie 2015 – decembrie 2016.

Pentru al doilea studiu, au fost selectate pacientele eligibile care au fost îndrumate pentru LEEP în Secția de Obstetrică și Ginecologie a Spitalului Municipal Timișoara, în perioada ianuarie 2018 – decembrie 2020.

Investigația retrospectivă și prospectivă a fost realizată prin selecția cazurilor consecutive pe baza criteriilor de includere/excludere stabilite în funcție de obiectivele științifice.

REZULTATE

I. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: STUDIUL ACURATEȚEI DUBLEI TESTĂRI (DUAL-STAINING) P16/KI-67 COMPARATIV CU TESTAREA PAPILLOMA VIRUSULUI UMAN (HPV) LA FEMEILE CU CITOLOGIE ANORMALĂ SUB 30 DE ANI

Un total de 310 paciente cu ASC-US sau L-SIL pe citologia cervicală au fost îndrumate pentru colposcopie la Secția de Obstetrică și Ginecologie a Spitalului Municipal Timișoara. Pacientele cu colposcopie negativă pentru leziuni de grad înalt au fost excluse din studiu. Restul de 161 de paciente cu ASC-US (67 de paciente; 42%) sau L-SIL (94 de paciente; 58%) au fost trimise pentru biopsie. Din 161 de paciente, 56 (35%) aveau <30 ani și 105 paciente (65%) aveau >30 de ani. În general, 102/161 de paciente (63%) au fost testate pozitiv pentru HR-HPV și 70/161 de paciente (43%) au fost pozitive pentru p16/Ki-67. CIN2-3 a fost detectat prin biopsie la 99/161 de paciente (61%). În grupul ASC-US, 38/67 de paciente (57%) au fost pozitive pentru HR-HPV, iar 27/67 (40%) au fost pozitive pentru testul p16/Ki-67. În grupul L-SIL, 64/94 de paciente (68%) au fost HR-HPV-pozitive și 43/94 (46%) au fost p16/Ki-67-pozitive. La femeile peste 30 de ani, în grupul ASC-US, rata pozitivității HR-HPV a fost de 63% (27/43 paciente) și pozitivitatea p16/Ki-67 a fost de 42% (18/43 paciente). La pacientele cu L-SIL peste 30 de ani, rata pozitivității HR-HPV a fost de 77% (48/62 paciente) și pozitivitatea p16/Ki-67 a fost de 37% (23/62 paciente). La femeile cu vârsta sub 30 de ani, în grupul ASC-US, rata pozitivității HR-HPV a fost de 45% (11/24 paciente) și pozitivitatea p16/Ki-67 a fost de 37% (9/24 paciente). În grupul L-SIL cu mai puțin de 30 de ani, rata de pozitivitate pentru testul HR-HPV a fost de 50% (16/32 paciente) și pentru dual-staining p16/Ki-67 a fost de 62% (20/32 paciente). La femeile cu CIN2-3 detectat prin biopsie și cu vârsta <30 de ani, pozitivitatea HR-HPV a fost de 50% (7/14 paciente) în grupul ASC-US și 83% (15/18 paciente) în grupul L-SIL. Rata pozitivității p16/Ki-67 a fost de 57% (8/14) și, respectiv, 88% (16/18 paciente) în cele două grupuri. Sensibilitatea și specificitatea generală a genotipării HPV pentru detectarea CIN2-3 au fost de 79% și, respectiv, 72% în lotul de

paciente cu ASC-US, și de 85% și respectiv 64% în grupul de paciente cu L-SIL. . Ratele de sensibilitate și specificitate ale dual-staining p16/Ki-67 pentru CIN2-3 au fost de 66% și, respectiv, 93% în grupul ASC-US și 59% și, respectiv, 79% în grupul L-SIL. Specificitatea dual-staining p16/Ki-67 a fost semnificativ crescută în grupul de paciente <30 de ani, comparativ cu pacientele cu vârsta > 30 de ani ($p < 0,001$) atât în grupul ASC-US, cât și L-SIL.

II. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: STUDIUL ROLULUI DUAL-STAINING P16/KI-67 ÎN MANAGEMENTUL PACIENTELOR SUB 30 DE ANI CU ASC-US/L-SIL

Un total de 60 de paciente au fost incluse în studiu și au finalizat evaluarea de urmărire. Am evaluat corelația și distribuția p16 și Ki-67 la pacientele cu infecție cu HPV, infecție HR-HPV (HPV cu risc crescut) și test HPV negativ și persistența infecției cu HPV, HR-HPV și dual-staining pozitiv la 6 și 12 luni după LEEP. Am evaluat corelația dintre gradul histologic al leziunilor cervicale intraepiteliale de grad scăzut (CIN1), de grad înalt – CIN2+ (CIN2 și CIN3) și carcinom în situ (CIS) cu expresia imunohistochimică (IHC) a p16/Ki-67 și HR-HPV. Vârsta medie a pacientelor a fost de 23,4 ani. Un număr de 37 de paciente (61,6%) au avut L-SIL și 23 de paciente (38,3%) au avut rezultat ASC-US la citologia cervicală înainte de LEEP. În ceea ce privește colposcopia, 51 de paciente (85%) au avut un rezultat anormal și 9 paciente (15%) au avut rezultate normale. Numărul mare de colposcopii anormale ar putea fi explicat prin includerea în studiul nostru a numai pacientelor cu indicație de conizație. 52 de paciente (86,6%) au avut infecție cu HPV înainte de LEEP, iar 36 de paciente (60%) au avut infecție HR-HPV. HPV tipurile 16 și 18 au fost cele mai frecvent întâlnite, la 22 și respectiv 15 paciente. 21 de paciente au prezentat o infecție persistentă cu HPV la 6 luni după LEEP, dintre care 20 au avut HR-HPV. La 12 luni după LEEP 7 paciente au avut o infecție persistentă cu HPV, 6 paciente prezentând o infecție HR-HPV. HPV tip 16 a fost cel mai frecvent întâlnit în infecția persistentă – 7 paciente prezentând infecție persistentă la 6 luni și 3 paciente la 12 luni după LEEP. Dual-staining p16/Ki-67 a fost pozitiv la 31 de paciente înainte de LEEP, la 27 de paciente pe piesa de conizație, la 3 paciente la 6 luni după LEEP și la 2 paciente după 12 luni. În ceea ce privește examenul histopatologic al piesei de conizație, s-au obținut următoarele rezultate: 29 de paciente cu CIN I, 18 paciente cu CIN II, 10 paciente cu CIN III și 2 paciente cu carcinom *in situ*.

Sensibilitatea și specificitatea pentru CIN2+ confirmat prin biopsie au fost încrucișate pentru fiecare test. Pentru CIN2+ confirmat prin biopsie, am analizat, de asemenea, sensibilitatea și specificitatea combinațiilor de genotipare HR-HPV, dual-staining p16/Ki-67 și colposcopie pentru toate pacientele și separat pentru grupurile ASC-US și L-SIL. HR-HPV a arătat o sensibilitate mai mare în grupul L-SIL (76%), dar o specificitate mai mică (50%). În grupul ASC-US, specificitatea HR-HPV a fost de numai

43% și specificitatea a fost de 22%. Colposcopia a avut o sensibilitate mai mare în comparație cu HR-HPV, dar o specificitate foarte scăzută. Dual-staining a avut cea mai bună specificitate pentru grupul ASC-US. Combinația A (HR-HPV + colposcopie) a avut cea mai scăzută specificitate dintre toate combinațiile de teste. Combinațiile B (HR-HPV + p16/Ki-67), C (colposcopie + p16/Ki-67) și D (HR-HPV + colposcopie + p16/Ki-67) au prezentat o specificitate comparabilă, foarte mare; totuși, sensibilitatea a fost mai mică pentru combinațiile B și D în comparație cu combinația C. p16/Ki-67 singur sau în combinație cu colposcopie și/sau HR-HPV a îmbunătățit specificitatea generală pentru detectarea CIN2+. Marile de rezecție au fost negative (în țesutul sănătos) pentru toate pacientele și nu a fost efectuat niciun tratament chirurgical suplimentar în perioada de urmărire de 12 luni. Citologia cervicală s-a dovedit a fi normală (NILM) pentru toate pacientele la 6 și 12 luni de urmărire după LEEP. Pentru pacientele cu infecție persistentă HR-HPV și/sau cu dual-staining pozitiv la 6 și respectiv 12 luni după LEEP am recomandat o urmărire la interval de 3 luni prin co-testare (adică citologie cervicală și detecție HR-HPV). Niciun alt tratament nu a fost aplicat până în prezent.

III. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: NOI PERSPECTIVE ÎN DIAGNOSTICUL VARIANTELOR RARE DE ADENOCARCINOM ALE COLULUI UTERIN – PREZENTARE DE CAZ ȘI REVIEW AL LITERATURII

Am raportat cazul unei paciente de 29 de ani cu L-SIL, HPV negativ, dual-staining p16/Ki-67 pozitiv și colposcopie sugestivă pentru leziune displazică severă. Pacienta a fost supusă unei proceduri de excizie electrochirurgicală în ansă (LEEP), raportul patologic evidențiind hiperplazie mezonefrică și adenocarcinom mezonefric. Pacienta a optat pentru un tratament non-standard de conservare a fertilității. Raportul de patologie de trachelectomie a descris o zonă de hiperplazie la limita rezecției spre istmul uterin. Au fost efectuate două interpretări suplimentare ale lamelor și imunohistochimie (IHC). Rezultatele au susținut diagnosticul de adenocarcinom mezonefric, deși cu dificultate în diferențierea acestuia de hiperplazia mezonefrică. Având în vedere rezultatele patologice discordante care au fost neconcludente în stabilirea unui diagnostic precis al leziunii și a stării marginilor de rezecție, pacienta a fost îndrumată la un specialist în străinătate. În plus, s-a efectuat interpretarea suplimentară a lamelor și a IHC, rezultatele sugerând un carcinom cu celule clare. Dual-staining-ul p16/Ki-67 pozitiv înainte de LEEP, IHC nespecifică și dificultățile în stabilirea unui diagnostic constituie particularitățile cazului.

CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE

În primul nostru studiu, am obținut rezultate similare cu cele raportate anterior în studiile retrospective. Testul dual-staining a avut rezultate semnificativ mai bune din punct

de vedere al specificității la grupul de paciente sub 30 de ani. Pentru primul nostru studiu retrospectiv am ajuns la concluzia că dual-staining p16/Ki-67 singur sau în combinație cu HR-HPV și/sau colposcopia a arătat o specificitate mai mare decât HR-HPV și/sau colposcopia pentru diagnosticul de CIN2+ confirmat prin biopsie la pacientele sub 30 de ani. Colposcopia+p16/Ki-67 și colposcopia HR-HPV+p16/Ki-67 au arătat cea mai mare specificitate în studiul nostru. Considerăm că p16/Ki-67 ar putea fi util în triajul pacientelor tinere cu ASC-US sau L-SIL și ar trebui luat în considerare pentru algoritmul de diagnostic al acestui subgrup de paciente.

Rezultatele primului nostru studiu, realizat retrospectiv, ne-au încurajat să realizăm un al doilea studiu prospectiv pentru pacientele sub 30 de ani, pentru a cuantifica rolul dual-staining p16/Ki-67 și al genotipării HPV în detectarea leziunii cervicale de grad înalt la pacientele cu ASC-US sau L-SIL pe citologia cervicală.

În cel de-al doilea studiu, am evaluat corelația și distribuția dual-staining p16/Ki-67 la pacientele cu infecție cu HPV, infecție HR-HPV (HPV cu risc crescut) și test HPV negativ și persistența infecției cu HPV, HR-HPV și dual-staining pozitiv la 6 și 12 luni după LEEP. De asemenea, am evaluat corelația dintre gradul histologic al leziunilor cervicale intraepiteliale de grad scăzut (CIN1), de grad înalt – CIN2+ (CIN2 și CIN3) și carcinomul in situ (CIS) cu expresia imunohistochimică (IHC) a p16/Ki-67 și infecției cu HR - HPV.

Distribuția diferită de vârstă are un impact important asupra ratei pacientelor HR-HPV pozitive. În studiul nostru, vârsta medie a pacientelor a fost de 23,4 ani.

O prevalență foarte mare a infecției cu HPV a fost raportată în literatură la pacientele cu LSIL (86-97%) și ASC-US (89,5%). Infecția cu HPV a fost detectată și la 27% dintre pacientele cu rezultate negative pentru leziuni intraepiteliale sau maligne (NILM) (18). S-a raportat că infecția HR-HPV este mai frecventă la femeile sub 30 de ani cu citologia anormală, comparativ cu femeile mai în vârstă (14,19). În studiul nostru am avut următoarea distribuție a infecției cu HPV: 52 de paciente (86,6%) au avut infecție cu HPV înainte de LEEP, iar 36 de paciente (60%) au avut infecție HR-HPV. 33 din 37 de paciente din grupul L-SIL au avut infecție cu HPV înainte de LEEP, iar 23 au avut tulpini HR-HPV. În ceea ce privește grupul ASC-US, 19 din 23 de paciente aveau infecție cu HPV înainte de LEEP, dintre care 13 aveau HR-HPV.

Am reușit să comparăm performanța dual-staining p16/Ki-67 și a genotipării HPV în detectarea leziunilor cervicale de grad înalt la pacientele cu ASC-US sau L-SIL pe citologie cervicală (test Papanicolau), pentru a cuantifica performanța dual-staining p16/Ki-67 în detectarea CIN2+ la pacientele cu ASC-US sau L-SIL pe citologia cervicală, pentru a analiza distribuția și expresia p16/Ki-67 la pacientele cu infecție cu HR-HPV (tulpină unică sau co- infecție), pentru a evalua persistența p16/Ki-67 și HR-HPV pozitiv după LEEP. De asemenea, am evaluat performanța pentru detectarea CIN2+ a fiecărui test

individual și cea mai bună combinație de teste și impactul distribuției de vârstă asupra ratei pacienților HR-HPV pozitive și p16/Ki-67 pozitive.

Deși exista numeroase date disponibile din studii retrospective cu privire la specificitatea îmbunătățită a dual-staining la femeile tinere cu ASC-US sau L-SIL în comparație cu genotiparea HPV, din cunoștințele noastre, al doilea studiu reprezintă primul studiu prospectiv efectuat până acum pentru acest grup specific de pacienți.

În plus, am comparat, de asemenea, acuratețea combinațiilor dual-staining p16/Ki-67 cu genotiparea HPV și cu colposcopia pentru a identifica combinația de teste care oferă cea mai bună acuratețe pentru predicția CIN2+.

Punctul slab al studiilor noastre este numărul relativ scăzut de cazuri implicate. Sunt necesare mai multe date pentru a valida utilizarea dual-staining p16/Ki-67 ca parte a unui algoritm de management pentru paciențele cu anomalii citologice pe frotiul Papanicolau.

De asemenea, am identificat și raportat un caz variantă rară de adenocarcinom non-HPV de cancer de col uterin cu dual-staining pozitiv înainte de LEEP. Diagnosticul citologic este dificil în diferențierea hiperplaziei sau inflamației de celulele maligne în majoritatea cazurilor și rezultate discordante ale imunohistochimiei între laboratoare pot fi întâlnite frecvent în practica clinică (20–22). Aceste constatări sugerează prudență în diagnosticul inițial prin imunohistochimie. Considerăm că este important să recunoaștem aceste variante rare de adenocarcinom cervical într-un stadiu incipient, deoarece pot asocia un prognostic prost, dat fiind stadiul de obicei avansat la momentul diagnosticului. De asemenea, dual-staining-ul pozitiv în acest caz deschide o fereastră de oportunitate pentru utilizarea ulterioară a p16/Ki-67 pentru diagnosticul variantelor rare de cancer de col uterin non-HPV.

În studiile noastre, dual-staining p16/Ki-67 a arătat o specificitate superioară în comparație cu testul de genotipare HPV, în special la grupul de Paciente sub 30 de ani. Datele noastre indică faptul că dual-staining p16/Ki-67 ar putea fi o opțiune în triajul pacienților mai tinere de 30 de ani cu ASC-US sau L-SIL la examenul citologic cervical, înainte de a efectua colposcopie și biopsie. Prin urmare, beneficiul major al utilizării dual-staining p16/Ki-67 ca triaj pentru colposcopie ar consta în posibilitatea de a reduce considerabil numărul de trimiteri pentru colposcopie și poate reduce impactul tratamentului excesiv al leziunilor precursoare.

Considerăm că studiile noastre reprezintă o contribuție importantă în domeniu, cu noutatea de a fi efectuat primul studiu prospectiv pentru paciențele sub 30 de ani pentru evaluarea dual-staining p16/Ki-67 în triajul pacienților cu ASC-US/LSIL.

Rezultatele noastre sugerează că dual-staining ar trebui luat în considerare în algoritmul de management al acestui subgrup specific de pacienți.

REFERINTE

1. Stoler MH, Wright TCJ, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol*. 2011 Mar;135(3):468–75.
2. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol*. 2015 Feb;136(2):189–97.
3. Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NWJ, Heideman DAM, et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012 Jan;13(1):78–88.
4. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJF, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet (London, England)*. 2014 Feb;383(9916):524–32.
5. Thrall MJ, Smith DA, Mody DR. Women ≥ 30 years of age with low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) have low positivity rates when cotested for high-risk human papillomavirus: should we reconsider HPV triage for LSIL in older women? *Diagn Cytopathol*. 2010 Jun;38(6):407–12.
6. Force USPST. Screening for Cervical Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA [Internet]*. 2018;320(7):674–86. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.10897>
7. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, Chelmow D, Einstein MH, Garcia F, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis*. 2020 Apr;24(2):102–31.
8. Practice Bulletin No. 168: Cervical Cancer Screening and Prevention. *Obstet Gynecol*. 2016 Oct;128(4):e111–30.
9. Maver PJ, Poljak M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clin Microbiol Infect [Internet]*. 2020;26(5):579–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X19304914>
10. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 Jul;28(suppl_4):iv72–83.
11. Palla V-V, Karaolani G, Moris D, Antsaklis A. Sentinel lymph node biopsy in uterine cervical cancer patients: ready for clinical use? A review of the literature. *ISRN Surg*. 2014;2014:841618.
12. Allia E, Ronco G, Coccia A, Luparia P, Macrì L, Fiorito C, et al. Interpretation of p16(INK4a) /Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. *Cancer Cytopathol*. 2015 Apr;123(4):212–8.
13. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Aug;18(15):4154–62.
14. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol*. 2015 Jun;123(6):373–81.
15. Possati-Resende JC, Fregnani JHTG, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A,

- Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134445.
16. Secosan C, Pasquini A, Zahoi D, Motoc A, Lungeanu D, Balint O, et al. Role of Dual-Staining p16/Ki-67 in the Management of Patients under 30 Years with ASC-US/L-SIL. *Diagnostics*. 2022;12(2):403.
 17. Einstein MH, Garcia FAR, Mitchell AL, Day SP. Age-stratified performance of the Cervista HPV 16/18 genotyping test in women with ASC-US cytology. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2011 Jun;20(6):1185–9.
 18. Evans MF, Adamson CS-C, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K. Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer*. 2006 Mar;106(5):1054–64.
 19. Zuna RE, Wang SS, Rosenthal DL, Jeronimo J, Schiffman M, Solomon D. Determinants of human papillomavirus-negative, low-grade squamous intraepithelial lesions in the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesions triage study (ALTS). *Cancer*. 2005 Oct;105(5):253–62.
 20. Hanselaar A, van Loosbroek M, Schuurbijs O, Helmerhorst T, Bulten J, Bernhelm J. Clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix. An update of the central Netherlands registry showing twin age incidence peaks. *Cancer*. 1997 Jun;79(11):2229–36.
 21. Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG, et al. Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2000 Oct;157(4):1055–62.
 22. Mikami Y, McCluggage WG. Endocervical glandular lesions exhibiting gastric differentiation: an emerging spectrum of benign, premalignant, and malignant lesions. *Adv Anat Pathol*. 2013 Jul;20(4):227–37.