

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL
DAVILA” BUCUREȘTI
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

*SUPRAVEGHEREA INTERDISCIPLINARĂ
MODERNĂ A RISCULUI PENTRU
NEOPLASMUL DE COL UTERIN*

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC

ACAD. PROF. DR. PETRACHE VÎRTEJ

DOCTORAND

ALEXANDRU V.D. BAROȘ

**BUCUREȘTI
2017**

Rezumatul respectă numerotarea și cuprinsul tezei. Cuprinde o selecție a referințelor bibliografice existente în cadrul tezei de doctorat, respectând numerotarea acestora și o selecție a listei de abrevieri.

Teza de doctorat conține 128 de pagini, 14 tabele, 44 de figuri, 270 de referințe bibliografice și 11 pagini de anexe.

Cuvinte cheie: *virusul HPV, cancer de col uterin, testare ADN HPV, dubla imunomarcare citologică (CINtec PLUS), citologie Pap.*

Mulțumiri

Pe această cale doresc să îmi exprim recunoștința pentru sprijinul acordat de către dl. Acad. Prof. Dr. Petrache Vârtej, conducătorul de doctorat și să adresez sincere mulțumiri pentru îndrumarea acordată și implicarea sa constantă pe tot parcursul statutului de doctorand.

De asemenea, doresc să îmi exprim recunoștință și să mulțumesc dnei Dr. Mihaela Badea, personalitate marcantă în comunitatea științifică românească, cu înaltă expertiză în studiul HPV și în patologia precanceroasă a colului uterin.

CUPRINS

	Pg.
LISTĂ DE ABREVIERI	4
LISTA FIGURILOR	6
LISTA TABELELEOR	8
INTRODUCERE - MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI DOCTORAL	9
PARTEA I – SINTEZA DATELOR DIN LITERATURA DE SPECIALITATE	
1. VIRUSUL PAPILLOMA UMAN – PREZENTARE GENERALĂ	12
1.1 Particularități structurale ale virusului HPV	12
1.1.1. Structura virionilor și organizarea genomului viral	14
1.2.2. Geneza tumorală	12
1.2 Infecția cu virusul HPV	18
1.2.1. Ciclul de viață, istoria naturală și imunologia virusului uman Papilloma	18
1.2.2. Infecția cu virusul HPV a tractului genital și mecanismele infectării	19
1.2.3. Epidemiologia infecției cu virusul HPV și factorii de risc	23
1.2.4. Clasificarea tipurilor de HPV în funcție de risc și manifestările clinice ale infecției	26
1.2.5. Virusul Papilloma uman și cancerul de col uterin	28
1.2.6. Co-factorii implicați în dezvoltarea cancerului de col uterin	29
1.3 Evaluarea citologică a colului uterin	31
1.3.1. Raportarea rezultatelor citologice	31
1.4 Răspunsul imun la infecția cu virusul HPV	36
1.5 Replicarea virală în infecția cu virusul HPV	39
1.6 Prevenția infecției cu virusul HPV	41
1.6.1. Minimizarea expunerii	41

1.6.2. Vaccinarea	42
1.7 Diagnosticul infecției cu virusul HPV	46
2. TESTAREA ADN HPV ȘI LIMITELE ACESTEIA ÎN PATOLOGIA PRECANCEROASĂ A COLULUI UTERIN	50
2.1 Sensibilitatea clinică și specificitatea testării ADN HPV	51
2.2. Testarea HPV la femeile de 30 și peste 30 de ani	53
2.3 Testarea combinată (Testarea Pap+HPV) – Limitele testării HPV	54
3. TEHNICILE DE IMUNOCITOCHIMIE	56
3.1. Markerii moleculari pentru optimizarea depistării precancerului de col uterin – CINTEC PLUS în citologie	57
3.1.1. Studii privind sensibilitatea și specificitatea dublei colorații p16/ Ki -67	58
3.1.2. Interpretarea colorațiilor în imunocitochimia – p 16	58
3.1.3 Aplicațiile clinice ale proteinei p16 în displaziile de grad înalt	59
PARTEA A II A – CONTRIBUȚII PERSONALE	
1. SUPRAVEGHEREA RISCULUI PENTRU NEOPLASMUL DE COL UTERIN PRIN TESTAREA IMUNOCITOCHIMICĂ LA PACIENTELE CU ASC-US ȘI TIPAJ ADN HPV	60
1.1 Introducere. Obiectivele studiului	60
1.2 Material și metode	61
1.3 Rezultate	80
1.4 Concluzii și discuții	94
2. CONCLUZII GENERALE	97
3. PERSPECTIVE PE CARE LE DESCHIDE TEZA	98
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	99
ANEXĂ. LISTA DE ARTICOLE DIN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE BDI	117

LISTĂ SELECTIVĂ DE ABREVIERI

ASC – US - celule scuamoase atipice cu semnificație nedeterminată (Atypical Squamous Cells Undetermined Significance);
ASC – H – celule scuamoase atipice, fără a se putea exclude o leziune de grad înalt (Atypical Squamous Cells – cannot exclude high grade lesion);
AGC – celule glandulare atipice (Atypical Glandular Cells);
AIS – adenocarcinom in situ (Adenocarcinoma in situ);
ADN – acid deoxiribonucleic;
CIS – carcinom in situ (Carcinoma in situ);
CIN – neoplazie cervicală intraepitelială (Cervical Intraepithelial Neoplasia);
CIN II - neoplazie cervicală intraepitelială de grad II, displazie moderată (Moderate dysplasia);
CIN III - neoplazie cervicală intraepitelială de grad III, displazie severă sau carcinom in situ (Severe dysplasia);
CD – diferențiere de clasă a limfocitelor (cluster differentiation);
DAB – 3,3'-Diaminobenzidină
ERAD – electroresecția cu ansa diatermică;
Hc II – testul de captură a hibrizilor II (Hybrid Capture II);
HG-SIN – neoplasm intraepitelial de grad înalt (high grade intraepithelial neoplasia)
HPV – Virusul papiloma Uman (Human Papilloma Virus);
hrHPV – HPV grad risc înalt (high-risk human papillomavirus);
HSIL - leziune scuamoasă intraepitelială de grad înalt (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion)
LSIL – leziune scuamoasă intraepitelială de grad scăzut (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion);
NLIM – frotiu negativ pentru leziuni intraepiteliale sau maligne (Negative for Intraepithelial Lesion and Malignancy)
PCR – reacția de polimerizare în lanț (Polymerase Chain Reaction);
PCR-EIA - reacția de polimerizare în lanț – test imunologic enzimatic (polymerase chain reaction-enzyme immunoassay)
Pap - testul Babeș – Papanicolaou;
SCC – carcinom scuamos (Squamous cell carcinoma)
SCC – Squamous cell carcinoma

INTRODUCERE - MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI DOCTORAL

În România, cancerul colului uterin se situează pe locul doi ca incidență și mortalitate în ierarhia cancerelor genitale, după cancerul de sân și pe locul 4 în ierarhia celor mai frecvente cancere la femei în lume, devenind o certitudine că reprezintă o problemă importantă de sănătate publică. În țările dezvoltate riscul de a avea cancer de col uterin în decursul vieții este de 5%, în timp ce, în țările în curs de dezvoltare, acest risc este de 20-30%.

În prezent, România se află pe locul 1 în Europa în ceea ce privește mortalitatea prin cancer al colului uterin reprezentând, astfel, un aspect al vieții cotidiene care este foarte greu de ignorat. Studiile de virusologie și biologie moleculară din ultimele decenii au demonstrat că atât neoplasmul colului uterin cât și leziunile precursore sunt cauzate de infecția cu tulpinile cu risc oncogen crescut ale virusului uman papilloma (HPV).

Având în vedere cele expuse mai sus, alegerea subiectului prezentei teze a venit din dorința de a aprofunda această problemă tot mai stringentă a zilelor noastre și de a efectua un studiu cu privire la supravegherea riscului de neoplasm de col uterin, îmbunătățind, astfel, experiența profesională personală în acest domeniu.

Pentru creșterea eficienței strategiilor care ar trebui implementate în vederea prevenției și reducerii numărului foarte mare de cazuri de cancer de col uterin înregistrate în România, un factor important îl reprezintă deschiderea către tehnicile moderne, de actualitate, disponibile în acest domeniu. În acest sens, studiul de față și-a propus supravegherea riscului pentru neoplasmul de

col uterin prin testarea ADN HPV și imunocitochimică a unui lot de paciente din Clinica MICOMI cu rezultate ASC-US pozitive. Obiectivul final al acestui studiu a fost determinarea eficienței testului CINtec PLUS ca metodă de screening pentru depistarea leziunilor precanceroase ale colului uterin și stabilirea sensibilității și specificității acestei metode comparativ cu citologia PAP și testarea ADN HPV.

Partea a doua a lucrării reprezintă contribuția proprie ca urmare a efectuării unui studiu retrospectiv ce a avut ca obiectiv supravegherea riscului pentru neoplasmul de col uterin prin testarea imunocitochimică la pacientele cu ASC-US și tipaj ADN HPV.

Astfel, prin studiul de față s-a evaluat impactul clinic al testării imunocitochimice la pacientele cu diagnostic citologic ASC-US și tipaj AND HPV în clinica MICOMI.

PARTEA I – PREZENTAREA SUCCINTĂ A DATELOR DIN LITERATURA DE SPECIALITATE

2. TESTAREA ADN-HPV ȘI LIMITELE ACESTEIA ÎN PATOLOGIA PRECANCEROASĂ A COLULUI UTERIN

Testele HPV au avut o evoluție rapidă beneficiind de pe urma dezvoltării tehnicilor de laborator din domeniul biologiei moleculare și geneticii.

Metodele bazate pe amplificarea semnalului, apărute la sfârșitul anilor '90 sunt **Hybrid Capture**, **Cervista HPV HR** ambele fiind între timp aprobate de FDA.

Hybrid Capture2 este o metodă bazată pe amplificarea unui semnal non-radioactiv după

hibridizarea ADN HPV cu probe oligonucleotidice marcate fluorescent. Metoda detectează 13 tipuri de HPV cu risc înalt, fără a specifica ce tipuri anume sunt prezente în proba analizată. (120,194,195)

Cervista este utilizat clinic începând cu anul 2009 și are două teste diferite: unul pentru 14 tipuri cu risc, altul separat pentru tipurile 16 și 18.

Tehnicile bazate pe PCR au o bună sensibilitate și specificitate și sunt folosite pe scară largă.

2.1. Sensibilitatea clinică și specificitatea testării ADN

Problema cheie în ceea ce privește testarea ADN hrHPV pentru screening-ul de col uterin este detecția infecțiilor hrHPV care sunt asociate sau devin $\geq$ CIN 2 și diferențierea de infecțiile hrHPV tranzitorii. Acest lucru implică faptul că ar trebui să existe un echilibru între sensibilitatea clinică și specificitatea pentru detectarea $\geq$ CIN 2. În prezent, testele aprobate de FDA: Capture hibrid 2 (HC2; Qiagen, Gaithersburg, MD, SUA) și GP5 + / 6 + -PCR imunotest enzimatic (GP5 + / 6 + -PCR EIA) au demonstrat în mod repetat sensibilitatea clinică de aproximativ 90-95% pentru detectarea $\geq$ CIN 2 în cohorte prospective mari sau studii clinice aleatorii (200-206).

3. TEHNICILE DE IMUNOCITOCHIMIE

3.2 Markeri moleculari pentru optimizarea depistării precancerului de col uterin – CINTEC PLUS în citologie

Soluția care s-a dezvoltat în ultimii câțiva ani constă în utilizarea în secundar a unor markeri moleculari mai specifici pentru precancerul de col, care combină o sensibilitate înaltă cu o specificitate înaltă (fără ca acestea să fie absolute), între care cea mai studiată este colorația imunocitochimică duală p16/Ki-67.

Studiile publicate arată că sensibilitatea dublei colorații p16/Ki-67 este comparabilă cu cea a testării HPV, dar la o specificitate în mod semnificativ mai mare. (254)

PARTEA A II –A – CONTRIBUȚII PERSONALE

1. SUPRAVEGHEREA RISCULUI PENTRU NEOPLASMUL DE COL UTERIN PRIN TESTAREA IMUNOCITOCHIMICĂ LA PACIENTELE CU ASC-US ȘI TIPAJ ADN HPV

1.1 Introducere

Obiective - Evaluarea impactului clinic al testării imunocitochimice la pacientele cu diagnostic citologic ASC-US și tipaj ADN HPV în clinica MICOMI.

Pentru realizarea acestui obiectiv au fost analizate retrospectiv 183 de cazuri de paciente cu ASC-US și tipaj ADN HPV în clinică, în perioada 2014-2016.

Datele au fost analizate statistic pentru a determina sensibilitatea și specificitatea testării imunocitochimice, evitându-se gesturile invazive, în special la nulipare.

Rezultatele pozitive indică perturbarea ciclului celular, ca marcă directă a activității oncogenice a virusului HPV, reprezentând un criteriu obiectiv pentru selecția pacientelor cu risc crescut pentru dezvoltarea leziunilor cervicale de grad înalt, în vederea practicării colposcopiei.

Lotul de 183 de paciente a fost evaluat prin testare imunocitochimică și ulterior femeile cu rezultate pozitive ale testării au fost supuse evaluării colposcopice, în vederea determinării prezenței leziunilor cervicale. Cele cu rezultate pozitive la evaluarea colposcopică au primit

recomandare de efectuare a biopsiei, iar cele cu rezultate negative au fost urmărite pentru reevaluarea colposcopică la 4 luni.

Rezultatele negative ale testării imunocitochimice au fost supuse supravegherii citologice și virale la 12 luni.

1.2 Material și metode

Din baza de date a Clinicii Micomi® au fost selectate paciente cu diagnostic citologic de ASC-US la examenul citologic de rutină și tipaj ADN HPV, între anii 2014 și 2016. Datele au fost adunate retrospectiv, respectând criteriile prestabilite de includere și de excludere.

Criteriile de excludere a pacientelor din studiu:

- Citologiile cu leziuni de grad înalt
- Lipsa datelor anamnestice și clinice
- Lipsa analizei HPV
- Sarcina
- Histerectomia în antecedente

Criteriile de includere a pacientelor în studiu au fost:

- pacientele cu rezultat citopatologic cervico-vaginal de tip ASC-US
- pacientele care au avut efectuată testarea ADN HPV

Diagnosticul de ASC-US a fost stabilit pe baza următoarelor criterii citologice:

- Nuclei cu un volum de aproximativ 2,5 până la de 3 ori mai mare decât al unui nucleu normal al unei celule scuamoase intermediare (aproximativ 35 μm^2);
 - Ușoară alterare a raportului nucleu-citoplasmatic;
 - Minimă hipercromazie și iregularitate în distribuția cromatinei;
- Parakeratoză atipică (anomalii nucleare asociate cu o citoplasmă densă și orangeofilă);
 - Multinucleere.

Diagnosticul diferențial al ASC-US s-a realizat cu celelalte modificări celulare ce pot fi decelate pe frotiul cervical:

- ASC-H
- LSIL
- HSIL
- AGC-NOS
- Carcinom cervical scuamos
- Adenocarcinomul Cervical In Situ

Testarea HPV a fost efectuată folosind două metode:

1. Testul de detecție a grupului de HPV cu risc înalt cu genotiparea simultană pentru tipurile 16 și 18.

Prin această metodă se detectează principalele 14 tipuri de HPV cu risc oncogen crescut.

Dintre acestea, 12 tipuri (respectiv 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 și 68) sunt analizate ca grup, iar tipurile 16 și 18, de care se leagă riscul cel mai înalt oncogen, se identifică individual.

Rezultatul testului este pozitiv dacă în proba analizată sunt prezente:

- unul sau mai multe tipuri HPV dintre cele 12 incluse în amestecul care formează grupul de tipuri cu risc testat (fără să aflăm exact despre ce tip sau tipuri este vorba);

- numai tipul 16;
- numai tipul 18;
- orice combinație între grup și cele două genotipuri individualizate.

Rezultatul testului este negativ, dacă în proba pacientei nu se identifică niciunul dintre cele 14 tipuri cu risc oncogenic crescut testate.

2. Test genotipare HPV

Testele acestea folosesc tehnica de amplificare a secvenței de ADN țintă – bazate pe PCR.

Prin această metodă se are în vedere detecția a 37 tipuri de HPV care au grade diferite de risc oncogen (clasificate ca risc înalt, mediu și scăzut) și anume: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 și CP6108.

Rezultatul arată dacă infecția este unică sau multiplă, identifică și nominalizează tipul sau tipurile de HPV prezente în proba analizată și precizează categoria de risc din care acestea fac parte.

Protocolul de lucru pentru p16 + Ki67 (test CINTEC Plus) a fost următorul:

1. S-au incubat lamele în apa distilată, timp de 10 minute – THIN PREP.
2. S-a diluat EPITOPE RETRIEVAL (10x) și s-a așezat în baia de apă încălzită la 95.5 grade Celsius.
3. S-au inversat lamele rehidratate în ER timp de 10 minute, la 95,5 grade Celsius.
4. După incubare în baia de apă, s-au scos lamele și s-au răcit 24 de minute la temperatura camerei.
5. S-au clătit lamele răcite la temperatura camerei în WASH BUFFER (10X) 5 minute.
6. S-a pipetat PEROXIDASE BLOCKING 1 și s-a incubat 5 minute – contur NOVOPEN
7. S-au clătit lamele în WASH BUFFER pentru 5 minute.
8. S-au pipetat cei doi anticorpi primari p16 și Ki67 și s-au incubat 30 minute.
9. S-au clătit lamele în WASH BUFFER pentru 5 minute.

10. S-a pipetat VISUALIZATION HRP3 și s-a incubat pentru 15 minute.
11. S-au clătit lamele în WASH BUFFER 3 X 5 minute
12. S-a pipetat VISUALIZATION AP 4 (cu degradarea FAST RED) și s-a incubat 15 minute.
13. S-au clătit lamele în WASH BUFFER 3 X 5 minute
14. Prepararea DAB
15. Clătirea lamelor în apa distilată
16. Spălarea lamelor în WASH BUFFER pentru 5 minute
17. Prepararea FAST RED
18. Spălarea în WASH BUFFER pentru 5 minute
19. Spălarea în apa distilată pentru 30 secunde
20. Colorarea cu hematoxină – 2 minute
21. Clătire în apa de la robinet apoi o trecere ușoară în apa distilată pentru 1 minut
22. După ce s-a practicat ștergerea lamelor s-a pipetat mediul de montare CINTEC PLUS , fără bule de aer și fără lamelă deasupra
23. Uscarea orizontală la 37 – 60 grade Celsius sau timp de 12 ore la temperatura camerei
24. După uscarea completă se practică incubarea în XYLENE , pentru 20 minute
25. Interpretarea rezultatelor

1.3 Rezultate

Au fost selectate 183 de paciente evaluate în Clinica Micomi, care au îndeplinit criteriile de includere și excludere.

Aceste paciente au participat la screening-ul de rutină a cancerului de col uterin prin citologie Babeș - Papanicolaou și tipaj ADN-HPV de risc înalt, în perioada 2014-2016.

Criteriile de excludere au fost absența testării HPV (25 cazuri) sarcina (13 cazuri) și histerectomia în antecedente (13 cazuri).

Toate cele 183 de femei rămase în studiu au efectuat cele trei teste. Dintre acestea 42,7% (78) au avut vârstă cuprinsă între 19-29 de ani, iar 57,3% (105) au fost cu vârstă de 30 de ani sau mai mult. Din punct de vedere al parității, în lotul analizat un total de 97 de femei se încadrau în categoria de nulipare (53%) și un număr de 86 de femei se încadrau la categoria multiparității (47%)

Analiza statusului infecției HPV pe grupe de vârstă a evidențiat o rată mare a infecției HPV la pacientele sub 30 de ani (Tabelul II.3), cel mai probabil datorită prezenței unui număr mai mare de infecții HPV tranzitorii.

Tabel II 3. Statusul infecției HPV cu risc oncogenic crescut pe diferite grupe de vârstă

Grupa vârstă	Negativ pt risc oncogen înalt		Pozitiv pt. tulpină cu risc oncogen înalt		Total	P
	nr	%	nr	%	nr	
19-25	19	65.5%	10	34.5%	29	0.784*
26-30	35	62.5%	21	37.5%	56	0.318*
31-35	31	72.1%	12	27.9%	43	0.487*
36-40	24	64.9%	13	35.1%	37	0.662**
41-45	10	76.9%	3	23.1%	13	0.99**
46+	4	80.0%	1	20.0%	5	
	123	67.2%	60	32.8%	183	

* Test Chi² pentru grupe de vârstă succesive

** Test Fisher exact pentru grupe de vârstă succesive

Toate pacientele incluse în studiu au avut testare HPV cu risc oncogenic crescut. Având în vedere faptul că au fost folosite atât genotiparea HPV cât și detecția HPV+16/18, statusul HPV a fost stabilit ca pozitiv (infecție HPV cu risc oncogenic crescut prezentă, cu

precizarea tipului viral) sau negativ (infecție HPV cu risc oncogenic crescut absentă).

Astfel, din cele 183 de femei testate HPV, un număr de 60 au avut rezultate pozitive (infecție cu HPV 16/18 și/ sau infecție cu HPV grup de risc crescut), reprezentând 32,7% din lotul de paciente.

Restul de 123 de paciente testate HPV, reprezentând 67,2%, au avut un rezultat negativ (HPV cu risc înalt absent).

Toate pacientele incluse în studiu au avut rezultate citologice de tip ASC-US.

S-au raportat 83 de cazuri CINtec PLUS pozitive (dubla imunocitomarcare pozitivă), reprezentând 45,35% din totalul lotului studiat, respectiv 100 de cazuri CINtec PLUS negative, reprezentând 54,65% din lot, în timp ce ratele de pozitivare ale testării HPV au fost de 32,78% din lotul pacientelor (60 de cazuri).

Au fost efectuate **83 de colposcopii**, reprezentând 100% din recomandările de colposcopie secundare pozitivării testării imunocitochimice.

Pentru 27% din pacientele supuse colposcopiei, rezultatele au fost negative, iar restul lotului, reprezentând 73% cu rezultat pozitiv, a fost supus recomandării de biopsie excizională (electrorezecția cu ansă diatermică sau conizație).

În continuare, în urma efectuării biopsiei, într-un procent de 63,6% s-au înregistrat rezultate CIN2, 27,3% rezultate CIN 3 iar pentru 9,1% rezultatul a fost negativ. (Figura II.25)

Distribuția rezultatelor în urma efectuării biopsiei la pacientele cu dubla imunomarcare pozitivă

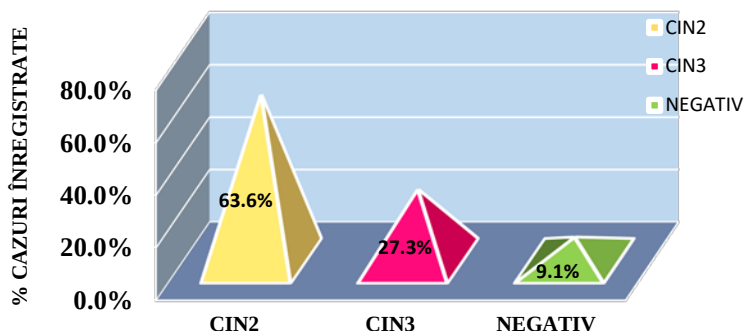


Figura II.25 Distribuția rezultatelor în urma efectuării biopsie la
pacientele cu dubla imunomarcare citologică pozitivă și colposcopie
pozitivă

În lotul studiat nu au fost identificate cazuri de
carcinom invaziv sau adenocarcinom.

Dintre pacientele cu rezultate CIN2, un procent de
42,8% erau nulipare, iar 57,1% multipare, din cele cu CIN
3 un procent de 73,3% erau nulipare și 26,6% multipare,
iar din cele 5 cazuri cu biopsie negativă toate erau
nulipare. (Figura II. 26)

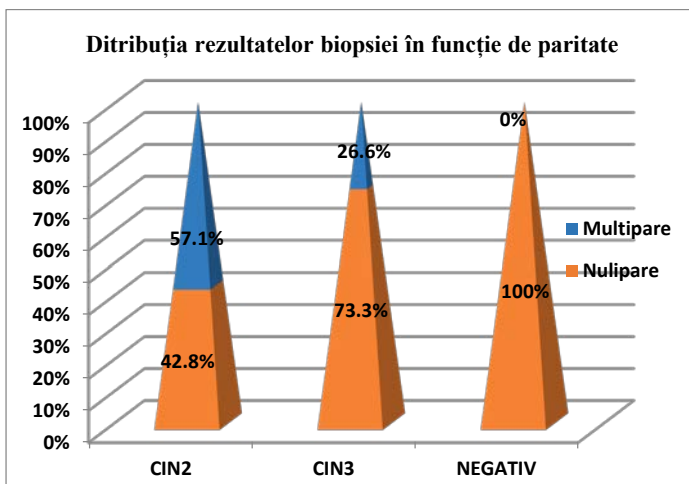


Figura II. 26 Distribuția rezultatelor biopsiei în funcție de paritate

În lotul pacienților cu rezultat histologic pozitiv, cel mai frecvent tip viral a fost HPV16 (18%), fiind urmat de HPV31 (16%) și HPV 59 (8%) (Figura II.28). În acest lot de paciente HPV16,31 și 59 sunt responsabile de 41% dintre infecții.

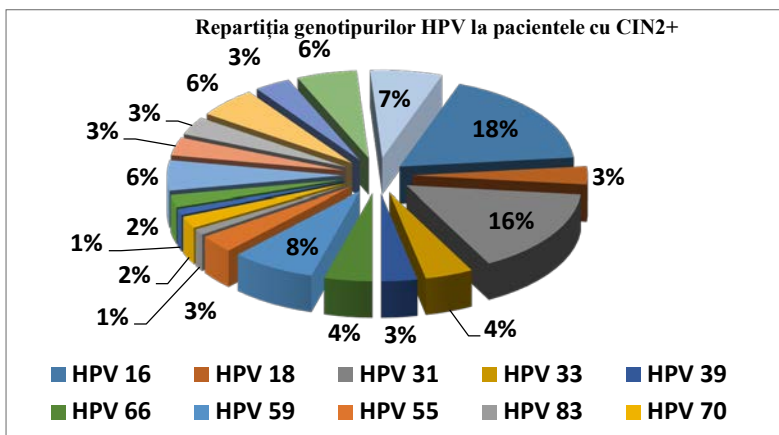


Figura II.28 Repartiția genotipurilor HPV la paciențele cu CIN2+

Rezultatul histopatologic la pacientele cu ASC-US și tipaj ADN HPV studiate funcție de vârstă.

Un vârf de frecvență a fost observat în grupul 26-30 de ani (Figura II.29).

Prezența leziunilor precanceroase la această categorie de vârstă sugerează începerea activității sexuale la vârste foarte mici și expunerea precoce la infecția persistentă cu HPV cu risc oncogenic crescut.

De menționat este faptul că pacientele cuprinse în acest studiu nu au fost vaccinate împotriva virusului HPV.

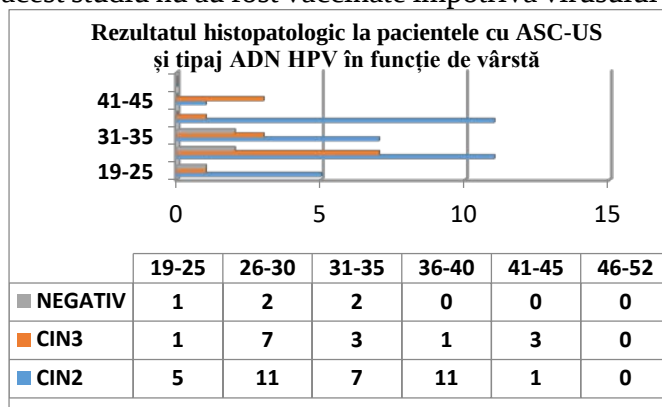


Figura II. 29 Distribuția rezultatelor histopatologice în funcție de grupul de vârstă la pacientele incluse în studiu.

Din totalul pacientelor aflate în studiu, un procent de 54,65% au fost cu testare imunocitochimică negativă. Aceste paciente au fost supuse urmăririi citologice și virale la 12 luni, neraportându-se ulterior niciun rezultat pozitiv privind prezența unei leziuni cervicale. Secundar practicării investigației colposcopice, pacientele care au avut rezultate negative au avut recomandarea de testare citologică și colposcopică la 4 luni, din nou neraportându-se nici un rezultat pozitiv la aceste teste. Femeile cu colposcopie pozitivă au avut recomandarea de biopsie, efectuată cu acul fin sau ERAD, în vederea evaluării histopatologice. (Figura II.30)

Metodologia de supraveghere a pacientelor aflate in studiu

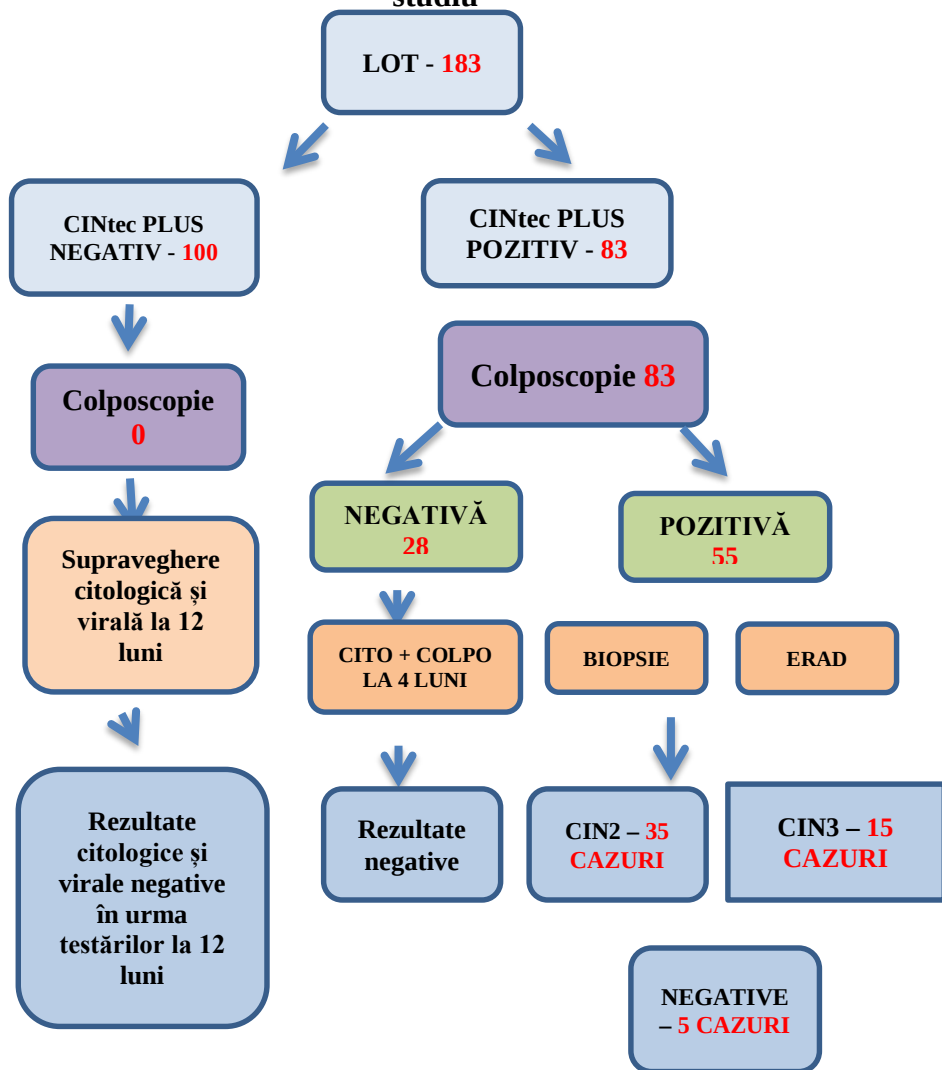


Figura II.30 Metodologia de supraveghere a pacientelor aflate in studiu

Prevalența rezultatelor pozitive ale testelor

Dintre cei 183 de subiecți cu toate cele trei teste efectuate, prevalența generală a rezultatelor pozitive a dublei imunocitomarcări a fost de 45%, iar prevalența testării HPV pozitive este de 33%. Ratele de pozitivitate ale testării imunocitochimice au fost asemănătoare în grupul de femei cu vârsta cuprinsă între 19-29 de ani și femeile cu vârsta de 30 de ani sau mai mult, iar prevalența ratei pozitive a testării HPV a fost în grupul de femei cu vârsta de 30 de ani sau mai mult (52%).

Ratele de prevalență ale testului imunocitochimic pozitiv au fost comparabile cu ratele de prevalență HPV în ambele grupe de vârstă (statistic ușor mai mari) și jumătate din rata de prevalență ale ASC-US (Figura II.31)

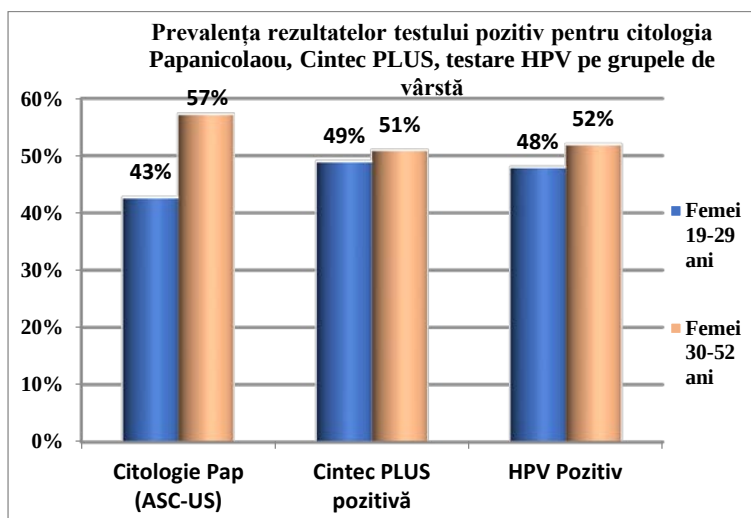


Figura II. 31 Prevalența rezultatelor testului pozitiv pentru citologia Papanicolaou, dubla imunomarcare citologică p16 / Ki-67 și testarea HPV

Sensibilitatea, specificitatea și valorile predictive pentru CINtec PLUS și testarea ADN HPV

S-au calculat sensibilitatea, specificitatea și valorile predictive pentru **CINtec PLUS** în relație cu leziuni CIN2 sau CIN 3 confirmate biopsic.

S-au avut în vedere rezultatele obținute conform protocoalelor clinice aplicabile fiecărui caz în parte.

- În 100 de cazuri în care rezultatele testării CINtec au fost negative, conform protocolului de supraveghere femeile au fost retestate viral și citologic la 12 luni. Toate aceste paciente au avut rezultate negative la citologie, fiind considerate non-bolnave.

- În 28 de cazuri colposcopiile efectuate au avut rezultate negative (fără indicație de biopsie). Femeile acestea au fost reevaluate citologic și colposcopic la 4 luni, rezultatul fiind pentru toate cazurile negativ ceea ce a dus la clasificarea lor ca persoane fără boală.

Astfel, datele obținute au fost utilizate în determinarea sensibilității și specificității testării CINtec plus ca metodă de screening pentru leziunile cervicale precanceroase (Tabel II.9).

Tabel II. 9 Testarea CINtec PLUS în relație cu starea de bolnav/nebolnav

CINtec PLUS	Boală		Total
	Prezentă	Absentă	
Pozitiv	50	33	83
Negativ	0	100	100
Total	50	133	183

Sensibilitate – (real pozitivi / bolnavi = 100%)

Specificitate – real negativi/ nonbolnavi = $100/133 = 75,2\%$

Valoarea predictivă pozitivă (VPP) – real pozitivi/ total pozitivi = $50 \cdot 100/83 = 60,2\%$

*Valoarea predictivă negativă (VPN) – real negativi *100/negativi = 100%*

În continuare s-a calculat validitatea și predicția pentru testarea HPV în relație cu starea de bolnav/nonbolnav, considerată după aceleași raționamente. (Tabel II.10)

S-au obținut următoarele rezultate:

Tabel II. 10 Testarea HPV în relație cu starea de bolnav/nonbolnav

Testare HPV pt. tulpini oncogene	Boala		Total
	Prezentă	Absentă	
Pozitiv	45	15	60
Negativ	5	118	123
Total	50	133	183

Sensibilitate – real pozitivi/ bolnavi = 90%

Specificitate - real negativi/ nonbolnavi = 118/133 = 88,7%)

*VPP = real pozitivi/ total pozitivi = 45*100/60 = 75%*

*VPN= real negativi *100/ negativi = 118*100/123 = 95,9%*

Astfel, în rândul femeilor de toate vârstele, sensibilitatea dublei imunocitomarcări pentru depistarea bolii a fost de 100%, mai mare comparativ cu testarea HPV (90%).

1.4. Concluzii și discuții

Concluzii

Din totalul pacientelor incluse în lotul studiat, prevalența rezultatelor pozitive a fost mai mare în cazul testării CIntec PLUS (83 de cazuri pozitive, reprezentând 45,35%), în timp ce ratele de pozitivare ale testării HPV au fost de 32,78% din lotul pacientelor (60 de cazuri).

Astfel, o concluzie a acestui rezultat ar putea fi utilitatea testării CINtec PLUS, având în vedere că din cele 123 de cazuri cu rezultat negativ la genotiparea HPV de risc înalt, un procent de 18,6% au avut un rezultat pozitiv la testarea CINtec PLUS. Ulterior, pacientele au fost supuse investigației colposcopice, rezultând leziuni cervicale pentru toate cazurile examinate. (21,7% din cazurile care au avut testare ADN HPV negativă și rezultate pozitive la testarea CINtec PLUS, s-au dovedit a fi CIN2 la biopsia efectuată cu acul fin).

Dubla imunomarcare a crescut sensibilitatea cu 10% față de testarea HPV la femeile de toate vârstele, cu o specificitate de 75,2%, mai mică comparativ cu testarea HPV.

Discuții

Un test de screening ideal ar trebui să aibă o specificitate și o sensibilitate crescute, cost accesibil, să nu implice riscuri și să conducă la detectare precoce reducând ratele mortalității.

Scopul prezentului studiu a fost evaluarea utilității dublei imunomarcări citologice bazată pe biomarkerii p16 și Ki67 în screening-ul pentru HGCIN.

Deși realizat la scară mică, rezultatele studiului efectuat confirmă în linii generale rezultatele altor studii asemănătoare care au testat sensibilitatea și specificitatea dublei imunomarcări citologice, în raport cu testarea citologică Pap și testarea ADN HPV.

Studiul PALMS, cel mai complex studiu realizat până în prezent, a avut ca obiectiv să urmărească menținerea unei sensibilități și specificități mărite a dublei imunomarcări citologice pentru CIN2+ comparativ cu citologia PAP și testarea ADN HPV. Rezultatele acestuia au confirmat parțial obiectivul propus, arătând că, la femeile de toate vârstele, sensibilitatea dublei

imunomarcări citologice este mai mare, decât în cazul citologiei Pap (86.7% vs 68.5%; $P < .001$) pentru detectarea CIN2+, cu o specificitate comparabilă (95.2% vs 95.4%; $P = .15$).

Concluziile PALMS indică un potențial rol al dublei imunomarcări citologice în screening, în special la femeile tinere acolo unde testarea HPV este limitată de prezența infecțiilor cu caracter tranzitoriu care conduc la rezultate fals pozitive.

Testarea dublei imunomarcări citologice la pacientele cu ASC-US din lotul studiat s-a dovedit foarte eficientă în identificarea leziunilor cervicale precanceroase (Sensibilitate 100% și VPN 100%), specificitatea și VPP fiind, de asemenea, mari (75,2% și respectiv 60,2%), dar studiul de față este limitat de numărul relativ mic al lotului studiat comparativ cu studiul PALMS care a evaluat o cohortă de 27.349 de femei din cinci țări europene, aspect deloc de neglijat având în vedere deosebirile de natură demografică în ceea ce privește ratele diferite de prevalență a cancerelor în general.

Astfel, într-un lot restrâns de femei probabilitatea ca rezultatele statistice să nu fie la fel de concludente, comparativ cu rezultatele unor studii ample cu același obiectiv, este mult mai mare.

Ca și concluzie generală, dubla imunomarcare citologică poate oferi atât sensibilitate ridicată, cât și specificitate pentru detectarea HGCIN într-un singur test.

În studiul de față s-a constatat că din lotul de paciente, cele 100 care au avut un rezultat negativ la testarea imunocitochimică și au fost urmărite prin testarea citologică și virală la 12 luni, nu au raportat ulterior modificări cervicale. La fel s-a constatat și în cazul pacientelor care au avut rezultat negativ la colposcopie și care au primit ca indicație reevaluarea citologică și

colposcopică la 4 luni (28 de cazuri.) În urma reevaluărilor nu s-au găsit modificări citologice și colposcopice care să indice leziuni cervicale.

Toate concluziile sunt limitate de caracterul studiului. Numărul redus de subiecți implică riscul ca unele dintre ipotezele formulate să fie valabile numai pentru categoriile studiate și să nu poată fi generalizate pentru populații mai mari.

Pentru a confirma concluziile cu privire la eficiența testării dublei imunocitochimii în trierea sau supravegherea pacientelor tinere cu rezultate citologice ASC-US cu HPV risc înalt pozitive sunt necesare studii ample, prospective și randomizate.

2. CONCLUZII GENERALE

Datele studiului au arătat că dubla imunomarcare citologică a crescut sensibilitatea cu 10% față de testarea HPV la femeile de toate vârstele, cu o specificitate de 75,2%.

Concluzia generală a studiului realizat este că prin utilizarea testării imunocitochimice p16/ Ki-67 se optimizează atitudinea medicală în trierea sau supravegherea pacientelor tinere cu rezultate citologice ASC-US și HPV risc înalt pozitive, se evită colposcopiile care nu sunt necesare (indicațiile de colposcopie se restrâng la cazurile CIntec PLUS pozitive), în felul acesta limitându-se gesturile invazive la nulipare.

Introducerea dublei marcări imunocitochimice în programele de screening pentru cancer de col uterin poate fi considerată o abordare strategică în depistarea precoce a leziunilor cervicale și, astfel, o metodă de supraveghere optimă în contextul reducerii incidenței cazurilor de cancer de col uterin în România.

3. PERSPECTIVE PE CARE LE DESCHIDE TEZA

- Deși studiul efectuat are un caracter retrospectiv și este limitat de numărul relativ mic al lotului, neputând avea un rezultat concludent la nivel național, aceste rezultate preliminare sunt destul de promițătoare în determinarea potențialului supravegherii riscului de cancer de col uterin prin intermediul imunocitochimiei ca metodă primară de screening.
- Având în vedere numărul redus de studii efectuate până în prezent, care au avut ca scop testarea comparativă a trei metode de screening în depistarea precoce a leziunilor cervicale, poate fi considerat un studiu util care să reprezinte un punct de plecare și o perspectivă pentru realizarea unor studii mai ample, randomizate ale căror rezultate să sprijine mai mult concluziile cu privire la eficiența testării dublei imunocitochimii în trierea sau supravegherea pacienților tineri cu rezultate citologice ASC-US și HPV risc înalt pozitive.
- Evoluția pacienților cu cancer de col uterin și necesitatea implementării unor programe de screening eficiente și accesibile la nivel național, sunt aspecte insuficient abordate în studiile din România în raport cu necesitățile actuale dictate de prevalența îngrijorător de mare a cancerului de col uterin în rândul femeilor din România.
- Creșterea îngrijorătoare a prevalenței infecțiilor cu virusul HPV la femeile tinere, face oportună realizarea unor sondaje care să vizeze nivelul de cunoaștere a fenomenului de către femeile tinere și în consecință identificarea unor programe eficiente de informare și conștientizare în masă cu privire la metodele de prevenție a căror rezultate să se poată fi ulterior cuantificate.

- Studiul demonstrează impactul pozitiv al aplicării celor mai moderne metode de screening disponibile pentru reducerea prevalenței leziunilor premaligne prin depistarea precoce și astfel îmbunătățirea calității vieții.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

120. Walboomers, J. M. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. F. Snijders, J. Peto, C. J. L. M. Meijer, and N. Munoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189:12-19.
194. Meijer CJ1, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer.* 2009 Feb 1;124(3):516-20.
195. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518–527. Disponibil la url: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571259>, (Accesat 15 decembrie 2016)
200. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S78–S89.
201. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, Mielzynska- Lohnas I, Rush BB, Schiffman M. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:46–52.
202. Bulk S, Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, AJ PB, Verheijen RH, Snijders PJ, Meijer CJ. Risk of high-grade cervical intra-epithelial neoplasia based on cytology and high-risk HPV testing at baseline and at 6-months. *Int.J.Cancer.* 2007;121:361–367.
203. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, Zappa M, Casadei GP, Carozzi F, Dalla Palma P, Del Mistro A, Folicaldi S, Gillio-Tos A, Nardo G, Naldoni C, et al. New Technologies for Cervical Cancer Working Group. Human Papillomavirus testing and liquid-based

cytology: results at recruitment from the New Technologies for Cervical Cancer randomized controlled trial. *J Natl. Cancer Inst.* 2006;98:765–774.

204. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Dalla Palma P, Del Mistro A, De Marco L, de Lillo M, Naldoni C, Pierotti P, Rizzolo R, Segnan N, Schincaglia, et al. New Technologies for Cervical Cancer Working Group. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2006;7:547–555.

205. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlée F, Franco EL Canadian Cervical cancer Screening Trial Study Group. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:1579–1588.

206. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, Wiener H, Daniel J, von Karsa L, editors. *European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening*. 2nd ed. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2008. pp. 1–291.

254. Clinica Micomi „Clinica de Colposcopie și Patologie a Tractului Genital Inferior” [online]; Disponibil la URL:

http://www.clinicamicomi.ro/index.php?option=com_content&view=article&id=121&Itemid=116, (Accesat septembrie 2016)

246. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001;92:276–84

257. Sari Aslani F, Safaei A, Pourjabali M, Momtahan M. Evaluation of Ki67, p16 and CK17 markers in differentiating cervical intraepithelial neoplasia and benign lesions. *Iran J Med Sci.* 2013;38:15–21.

**LISTA DE ARTICOLE PUBLICATE ÎN REVISTE
INDEXATE BDI**

Autor Principal

1. Alexandru Baroș, Vanessa Andrada Păun, Roxana Bohîlțea, Monica Cîrstoiu, Use of 9-valent HPV vaccine. A review, Vol. 13, No. 47 (1/2017) Gineco.eu [13] 34-36 [2017] DOI: 10.18643/gieu.2017.34@2017 Romanian Society of Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology

2. Alexandru Baroș, Roxana Bohîlțea, Monica Cîrstoiu, New molecular markers for cervical precancer detection optimization. Vol. 12 • No. 46 (4/2016), Gineco.eu [12] 180-182 [2016] DOI: 10.18643/gieu.2016.180@ 2016 Romanian Society of Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology

Major
TOPIC
Vaginal
Surgery

Gineco eu

RESEARCH ARTICLES

Sexual function
and vaginal surgery

page 5

CASE REPORTS

Severe neonatal
anemia due to acute
massive fetomaternal
hemorrhage - a case
and literature review

page 13

REVIEW ARTICLES

Use of 9-valent HPV
vaccine. A review

page 34



RESEARCH ARTICLES

- 5** Sexual function and vaginal surgery
C. Coroleucă, C.A. Ionescu, M. Dimitriu, I. Popescu, Cătălin A. Coroleucă, L. Șerbănescu
- 9** Corneal pachymetric particularities during hypertensive pregnancies. A clinical study.
Vanessa Andrada Paun, Liliana Voinea, Monica Cirstoiu, Alexandru Baros, Danut Vasile

CASE REPORTS

- 13** Severe neonatal anemia due to acute massive fetomaternal hemorrhage - a case and literature review
S. Vlădăreanu, C. Berceanu, D. Navolan, A. Boiangiu, C. Mehedințu
- 16** Debulking surgery for advanced stage ruptured ovarian carcinosarcoma with secondary hemoperitoneum and rectosigmoidian invasion. A case report and literature review
Nicolae Bacalbașa, Irina Bălescu, Mihai Dimitriu, Cristian Balalau, Nicolae Suciu
- 20** The abandonment *in utero* of the placenta in prolonged twin pregnancy after premature rupture of membranes
R.E. Bohilțea, N. Turcan, C.A. Ionescu, O. Toader, O. Munteanu, A. Baros, D. Voicu, M.M. Cirstoiu
- 23** Caesarian scar ectopic pregnancy - case report
Oana Toader, Alexandra Vintea, A Voichitoiu, N Suciu, Monica Cirstoiu, S. Esanu, Roxana Bohiltea
- 27** Off-label use of Misoprostol during childbirth, causing hypoxic ischemic encephalopathy. Legal and ethical consequences
Maria Aluas, Sorin Hostiuc, Tony Hangan, Diana-Denisa Mocan
- 30** Trisomy 18: an update on prenatal diagnosis and management. A case report
I. Dragan, C. Herghelegiu, S. Vladareanu, A. Moldoveanu, D. Oprescu

REVIEW ARTICLES

- 34** Use of 9-valent HPV vaccine. A review
Alexandru Baros, Vanessa Andrada Paun, Roxana Bohiltea, Monica Cirstoiu
- 37** Endometrial cancer prevention - does bariatric surgery play a role?
Irina Bălescu, Nicolae Bacalbașa
- 40** Assessment of risk factors for pulmonary embolism during pregnancy and puerpelium - management and maternal and neonatal outcomes - a literature review
Iulia Nicolescu Veselu, Andreea Boiangiu, Oana Solomon, Alexandru Filipescu, Radu Vladareanu, Simona Vladareanu
- 42** Controversies in polycystic ovarian syndrome
I. Popescu, C. Ionescu, M. Dimitriu, R. Bohilțea, R. Viezuină, B. Davitoiu, I. Pacu

EDITORS

Radu VLADAREANU (Romania)
Frank A. CHERVENAK (New York, USA)
Dan B. NAVOLAN (Romania)
Diana BADIU (Romania)

HONORARY EDITOR

Asim KURJAK (Croatia)

EDITORIAL BOARD

Nicolae BACALBASA, Romania (Surgical Oncology)
Chaira BENEDETTO, Italy (Obstetrics & Gynecology)
Elvira BRATILA, Romania (Obstetrics & Gynecology)
Monica CIRSTOIU, (Obstetrics & Gynecology)
Rudy Leon DEWILDE, Germany (Obstetrics & Gynecology)
Camelia DIACONU, Romania (Ultrasonography)
Hans-Christoph DUBA, Austria (Genetics)
Vladimir DVORAK, Czech Republic (Obstetrics & Gynecology)
Andrea GENAZZANI, Italia (Obstetrics & Gynecology)
Tony HANGAN, Romania (Dermato & Venereology)
Bernard HEDON, France (Obstetrics & Gynecology)
Peter HORNES, Denmark (Obstetrics & Gynecology)
Sorin HOSTIUC, Bucharest (Ethics & Legal Medicine)
Lazar IRIMIEA, Romania (Obstetrics & Gynecology)
Yavor KORNOVSKI, Bulgaria (Obstetrics & Gynecology)
Claudiu MARGINEAN, Romania (Obstetrics & Gynecology)
Dan MIHU, Romania (Obstetrics & Gynecology)
Mihai MITRAN, Romania (Obstetrics & Gynecology)
Marius MOGA, Romania (Obstetrics & Gynecology)
Dragos NEMESCU, Romania (Obstetrics & Gynecology)
Liana PLES, Romania (Obstetrics & Gynecology)
Joseph SCHENKER, Israel (Infertility)
Michael STARK, Germany (General Surgery)
Nicolae SUCIU, Romania (Obstetrics & Gynecology)
Jindřich TOSNER, CSC, Czech Republic (Obstetrics & Gynecology)
Alex. C. VIDAEFF, PhD, SUA (Maternal Fetal Medicine)
Simona VLADAREANU, Romania (Neonatology)
George VLASTOS, PhD, Switzerland (Gynecology)
Stefanos ZERVOUDIS, Greece (Gynecology)

STATISTICAL CONSULTANTS
Gencho GENCHEV, MD, PhD, Sofia, Bulgaria
Anca TUDOR, PhD, Romania

DESKTOP PUBLISHER

Ioana BACALU

PROOF-READING

Florentin CRISTIAN

PHOTO PROCESSING

Radu LEONTE



CEO

Dr. Simona MELNIC

MANAGER EDITORIAL

Eugenia BUDUREA

MANAGER EVENIMENTE

Elena OLTEANU

MANAGER VÂNZĂRI

George PAVEL

MANAGER ADMINISTRATIV

Alexandra CHIRILESCU

MANAGER ABONAMENTE

Mădălina ȘERBAN
abonamente@medichub.ro

Address:

Redacția și administrația:
S.C. VERSA PULS MEDIA S.R.L.
Green Gate, Bd. Tudor Vladimirescu nr. 22, etaj 11,
Sector 5, cod poștal 050883, București
Tel.: (031) 425.40.40, Fax: (031) 425.40.41
E-mail: redactia@medichub.ro
www.medichub.ro

Copyright © 2017 Medichub

All rights reserved. For total or partial reproduction, and in any form, printed or electronic, or distribution of materials published is required only with the written consent of the publisher.

The responsibility of original content of published articles belongs to original authors. Every interviewed person responds entirely for their statements. Also the buyers of advertised space are responsible for information included in their advertisements.

ISSN 2344-2379
e-ISSN 2537-110X
ISSN-L 2344-2379

Elsevier Bibliografic Database: SCOPUS

Use of 9-valent HPV vaccine. A review

Alexandru
Baros^{1,2},
Vanessa
Andrada Paun¹,
Roxana
Bohiletea^{1,2},
Monica
Cirstoiu^{1,2}

1. "Carol Davila" University
of Medicine and Pharmacy
Bucharest, Romania
2. Emergency University
Hospital Bucharest,
Obstetrics-Gynaecology,
Romania

Correspondence:
Dr. Alexandru Baros
e-mail: alexandrubaros@
yahoo.com

Abstract

Since 2006, vaccination against human papillomavirus (HPV) has been implemented in most developed countries. Two vaccines have been successfully used: a bivalent vaccine targeting (bHPV)- related cancers and a quadrivalent (qHPV) vaccine targeting both HPV-related cancers and genital warts. By 2015, a new nonavalent HPV (9vHPV) vaccine was granted by marketing authorization, first in the USA in 2014 and subsequently in Europe. The efficiency and/or immunogenicity of the 9vHPV has been assessed in the clinical studies which have been conducted so far and rendered positive results. The real impact of the 9vHPV wide use in comparison with the bHPV or qHPV cannot be specifically anticipated as it depends on different variables. However, the 5 further types in 9vHPV (HPV types 31, 33, 45, 52, and 58) increase the protection against cervical cancer to almost 90%. While, as mentioned above it is rather difficult to precisely assess the impact of this additional aim, it is nonetheless its significance in which the clinical studies conducted so far reported a successful rate of the 9vHPV vaccine use. Thus it can be argued that substituting the qHPV with the 9vHPV may justify a significantly higher impact on HPV-related cancers both in females and males.

Keywords: human papillomavirus vaccine, quadrivalent vaccine, nonavalent vaccine, clinical studies, cervical cancer

Introduction

Since 2006, vaccination against human papillomavirus (HPV) has been implemented in most developed countries. Until present, two vaccines have been successfully used: a bivalent vaccine targeting HPV- related cancers. In 2007 this vaccine received a positive view from the European Medicine Agency⁽¹⁾. Later on, in 2009, it was approved by the Food and Drug Administration (FDA). A quadrivalent vaccine, was later developed and called qHPV or 4vHPV, targeting both HPV-related cancers and genital warts. The latter gained approval from the FDA in 2006 and also received a positive view from the European Medicine Agency⁽²⁻⁴⁾.

Later on, in 2014 and 2015, a new nonavalent HPV vaccine (9vHPV) was granted marketing authorization in the USA and Europe. The 9vHPV was developed from the qHPV and includes five additional HPV types that should increase the level of protection toward HPV-related cancers^(1,5).

The 9vHPV vaccine (also known as Gardasil 9) has been approved for use in several countries (USA, Canada and subsequently in the European Union). This vaccine includes high-risk HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 types, along with low-risk HPV 6 and 11 types^(1,2,3,4,5).

What is 9Vhpv vaccine?

Up to present, the International Agency for Research on Cancer, under the World Health Organization, has classified 12 HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, and 59) among the "Group 1 carcinogens"⁽⁶⁾.

According to the European public assessment report for Gardasil 9, the Gardasil9 is administered for: condylomata acuminata, Papillomavirus infections, uterine cervical dysplasia and immunization. It is a vaccine used in males

and females, from the age of nine years, to protect against precancerous lesions and cancers in the cervix, vulva/vagina, anus and genital warts caused by HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 types⁽⁷⁻⁹⁾.

The vaccine contains purified proteins from the above-mentioned nine types of HPV and it is usually given in line with a 2 or 3-dose schedule for subjects between 9 to 14 years old and a 3 dose schedule for subjects 15 years old and over⁽⁹⁾. For a 2-dose schedule, the second dose should be administered 5 to 13 months after the first dose. For a three-dose schedule, the second dose should be administered 2 months after the first dose and the third after another 4 months⁽⁹⁾.

As mentioned above, this new vaccine comes in addition to the two HPV vaccines already commercially available in a large number of countries, namely Cervarix - a bivalent vaccine, targeting HPV 16 and 18 types, two HPV types that cause cervical cancer and Gardasil - a quadrivalent vaccine targeting the same oncogenic types and also HPV 6 and 11 types, which cause external genital warts^(5,10).

So far, millions of women and a smaller number of men have been immunized with these two HPV vaccines. Both vaccines protect against HPV 16/18 types related genital diseases, primarily against 50% of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2/3 and 70% of cervical cancer⁽⁷⁾.

The 5 further types in 9vHPV (HPV 31, 33, 45, 52, and 58 types) increase the protection against cervical cancer to almost 90%. For CIN1, CIN2 and CIN3 lesions, the increases are 20%, 30% and 30% respectively⁽⁸⁾ (Figure 1).

Efficiency of 9vHPV vaccine and clinical studies

Like with any other medicine on the market, the efficacy of Gardasil 9 has been assessed in several clinical studies,

Received:
January 09, 2017
Revised:
January 20, 2017
Accepted:
February 15, 2017

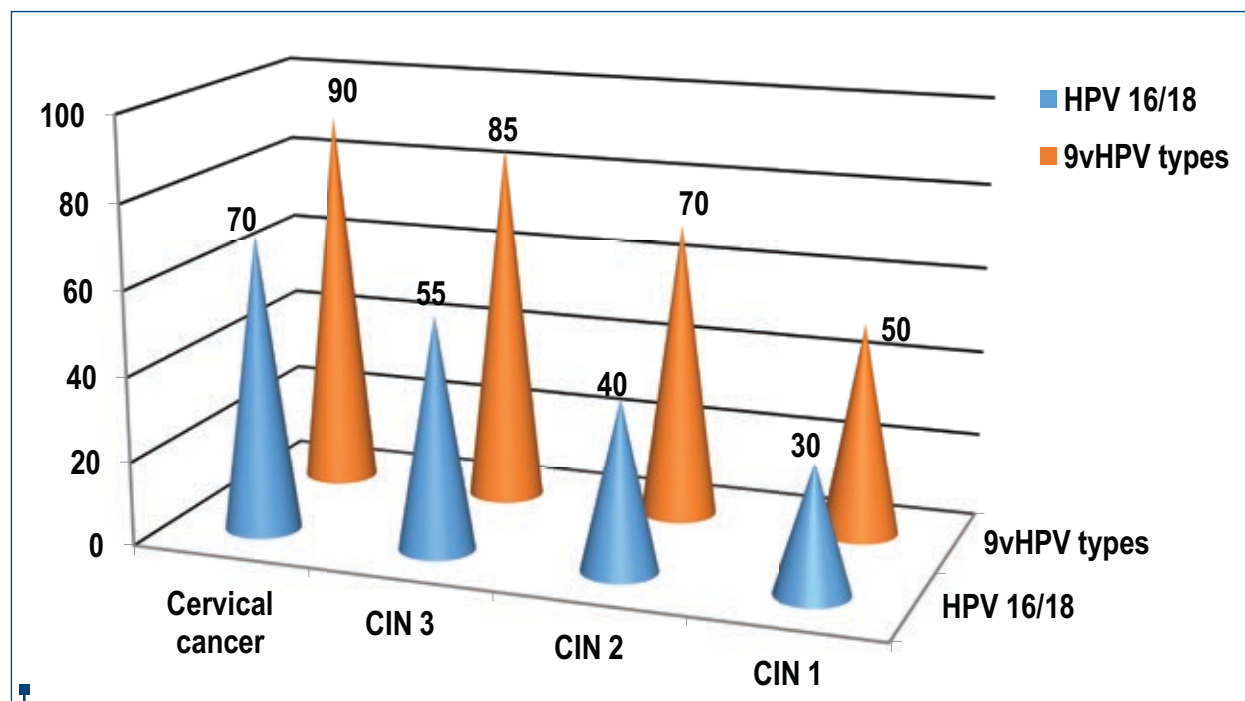


Figure 1. The increased protection against cervical cancer of 9vHPV additional types – 90% (adapted from Van Damme et al.⁽⁷⁾)

among which there are 5 main studies that are worth mentioning in this review⁽⁸⁾.

The first study targeted the effectiveness of Gardasil 9 in over 14.000 women (aged 16-26 years old). It focused on how many women that were given the 9vHPV vaccine developed a disease due to infection with HPV 31, 33, 45, 52 and 58 types as compared to women administered a quadrivalent vaccine which protects against types 6, 11, 16 and 18. The conclusion was that 1 of 6.016 women that were administered 3 doses of Gardasil 9 vaccine developed a disease linked to HPV 31, 33, 45, 52 and 58 types, compared to 30 women out of 6.017 who received 3 doses of Gardasil⁽⁸⁾.

The second study involved the administration of Gardasil 9 to 3.066 subjects divided in 2 groups (i.e. boys and girls aged 9 to 15 years old and young women aged 16 to 26 years old). As regards the first group of age it resulted that the levels of antibodies against all 9 types of HPV, one month after the 3rd dose, are satisfactory. The vaccine stimulated the adequate level of antibodies, thus providing a proper protection in comparison to the second group of age (women aged 16-26 years old) whose protection rate was demonstrated in the first study mentioned above⁽⁸⁾.

Another study conducted on 1.419 men aged between 16 and 26 years old versus 1.101 women aged between 16 and 18 years old measured the level of protection (level of antibodies against all 9 HPV types) after the administration of the third dose of Gardasil 9. It was concluded that both females and males were equally protected⁽⁸⁾.

The final relevant study, which was already mentioned above, focused on the efficiency of a 2 dose schedule versus a 3 dose schedule of Gardasil 9. The study was conduc-

ted on 1.518 subjects and monitored the development of antibodies 1 month after the administration of the last dose of Gardasil 9. It pointed out that the subjects administered two doses of Gardasil 9 have similar levels of protection against all nine virus types as those given three doses of Gardasil 9⁽⁹⁾. In support of this argument, another study on the cost versus efficiency of 2 versus 3 doses of 9vHPV vaccine, conducted in the United States, pointed out that either 2 or 3 doses have the same comparable vaccine effect, thus 2-dose schedules are fairly profitable^(10,11).

Clinical studies have showed that 9vHPV and qHPV are comparable in terms of efficacy against unremitting infection and cervical disease. The 9vHPV vaccine triggered a very strong immune response against all vaccine types, with sero-conversion rates closer to 100%. Swelling and pain, at the site of the injection, are more frequently noted after administration of 9vHPV than qHPV. It was reported to increase if the 9vHPV is co-administered with other vaccines⁽¹⁰⁾.

As shown in a study of a 9vHPV vaccine administered to subjects aged between 11 and 15 years, in association with Repevax (diphtheria, tetanus, pertussis and poliomyelitis vaccines), the 9vHPV vaccine turned out to be safe and highly successful against infection and diseases related to HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 types⁽¹⁰⁾.

This study concluded that concurrent administration of both 9vHPV vaccine and Repevax was on the whole well tolerated and did not interfere with the immune response to either vaccine, thus, reducing considerably the number of visits necessary to provide each vaccine individually⁽¹⁰⁾.

Conclusions

The 9vHPV was authorized on the market by the FDA in 2014. It is the third vaccine that became available on the market for the purpose of preventing diseases caused by HPV.

The efficiency of the relatively new vaccine has been reviewed in many clinical studies which all rendered positive results. The real impact of the 9vHPV wide use cannot be precisely anticipated as it depends on different variables. However the impact of this new

vaccine is linked to the broader coverage against five additional types of high-risk HPV. Also it is worth mentioning that the co-administration of 9vHPV with other immunization vaccines pointed out no significant interference.

In conclusion, the availability of new vaccine products on the market nowadays represents incredible breakthroughs, bringing the opportunity for implementing effective HPV vaccination programs worldwide that would lead to less prevalence of HPV related diseases. ■

References

1. FDA. FDA approves Gardasil 9 for prevention of certain cancers caused by five additional types of HPV. FDA; 2014.(Available from: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm426485.htm>)
2. Health Canada. Note of compliance information Gardasil 9. Health Canada, 2015. (Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/prodpharma/sbd-smd/drug-med/sbd_smd_2015_gardasil9_170006-eng.php)
3. Public Health Agency of Canada Update on Human Papillomavirus (HPV) Vaccines. Canada Communicable Disease Report 2012, 38, 9. (Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/12vol38/acs-dcc-1/index-eng.php>)
4. Therapeutic Goods Administration. Prescription medicines: registration of new chemical entities in Australia. Therapeutic Goods Administration, 2015. (Available from: <https://www.tga.gov.au/prescription-medicines-registration-new-chemical-entities-australia-2015>)
5. EMA. Gardasil 9 offers wider protection against cancers caused by human papillomavirus (HPV). EMA 2015. Available from: (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2015/03/news_detail_002295.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1)
6. International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Human, 2016. (Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>)
7. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S. et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer* 2012, 131, 2349-59.
8. Van Damme P, Bonanni P, Xavier Bosch F. et al. Use of the nonavalent HPV vaccine in individuals previously fully or partially vaccinated with bivalent or quadrivalent HPV vaccines. *Vaccine* 2016, Volume 34(6), 757-61.
9. European Medicines Agency Gardasil 9. Authorisation Details. [Last updated June, 2016]. (Available also from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003852/human_med_001863.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)
10. Kosalaraksa P, Mehlsen J, Vesikari T, et al. An open-label, randomized study of a 9-valent human papillomavirus vaccine given concomitantly with diphtheria, tetanus, pertussis, and poliomyelitis vaccines to healthy adolescents 11-15 years of age. *Pediatr Infect Dis J* 2015, 34(6), 627-34.
11. Laprise JF, Markowitz LE, Chesson HW, et al. Comparison of 2-Dose and 3-Dose 9-Valent Human Papillomavirus Vaccine Schedules in the United States: A Cost-effectiveness Analysis.(Available also from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27234416>)

Major
TOPIC
Labour

Gineco eu

CASE REPORT

Curative anterior pelvic exenteration for pelvic recurrence after irradiated, surgically treated cervical cancer. A case report and literature review

page 161

GENERAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY

Hemolytic disease by isoimmunization in Rh and ABO systems in newborns. A clinical study

page 172

REVIEW

Ultrasound during labour

page 211



EDITORS

Radu VLADAREANU (Romania)
 Frank A. CHERVENAK (New York, USA)
 Dan B. NAVOLAN (Romania)
 Diana BADIU (Romania)
 HONORARY EDITOR
 Asim KURJAK (Croatia)

EDITORIAL BOARD

Nicolae BACALBASA, Romania (Surgical Oncology)
 Chaira BENEDETTO, Italy (Obstetrics & Gynecology)
 Camil L. BOHILTEA, Romania (Medical Genetics)
 Elvira BRATILA, Romania (Obstetrics & Gynecology)
 Monica CIRSTOIU, (Obstetrics & Gynecology)
 Rudy Leon DEWILDE, Germany (Obstetrics & Gynecology)
 Camelia DIACONU, Romania (Ultrasonography)
 Hans-Christoph DUBA, Austria (Genetics)
 Vladimir DVORAK, Czech Republic (Obstetrics & Gynecology)
 Andrea GENAZZANI, Italy (Obstetrics & Gynecology)
 Tony L. HANGAN, Romania (Dermatovenerology)
 Bernard HEDON, France (Obstetrics & Gynecology)
 Peter HORNES, Denmark (Obstetrics & Gynecology)
 Sorin HOSTIUC, Romania (Legal Medicine & Bioethics)
 Lazar IRIMIEA, Romania (Obstetrics & Gynecology)
 Yavor KORNOVSKI, Bulgaria (Obstetrics & Gynecology)
 Claudiu MARGINEAN, Romania (Obstetrics & Gynecology)
 Dan MIHU, Romania (Obstetrics & Gynecology)
 Mihai MITRAN, Romania (Obstetrics & Gynecology)
 Marius MOGA, Romania (Obstetrics & Gynecology)
 Dragos NEMESCU, Romania (Obstetrics & Gynecology)
 Liana PLES, Romania (Obstetrics & Gynecology)
 Joseph SCHENKER, Israel (Infertility)
 Michael STARK, Germany (General Surgery)
 Nicolae SUCIU, Romania (Obstetrics & Gynecology)
 Andrei TICA, Romania (Clinical Pharmacology)
 Jindřich TOSNER, CSc., Czech Republic (Obstetrics & Gynecology)
 Alex. C. VIDAIEFF, PhD, SUA (Maternal Fetal Medicine)
 Simona VLADAREANU, Romania (Neonatology)
 George VLASTOS, PhD, Switzerland (Gynecology)
 Stefanos ZERVOUDIS, Greece (Gynecology)

STATISTICAL CONSULTANTS

Gencho GENCHEV, MD, PhD, Sofia, Bulgaria
 Anca TUDOR, PhD, Romania

DESKTOP PUBLISHER

Ioana BACALU

PROOF-READING

Florentin CRISTIAN

PHOTO PROCESSING

Radu LEONTE



**MEDICAL
SERVICES**



CEO

Dr. Simona MELNIC

MANAGER EDITORIAL

Eugenia BUDUREA

MANAGER EVENIMENTE

Elena OLTEANU

MANAGER VÂNZĂRI

George PAVEL

MANAGER ADMINISTRATIV

Alexandra CHIRILESCU

Address:

Redacția și administrația:
 VERSA MEDIA S.R.L.

Green Gate, Bd. Tudor Vladimirescu nr. 22, etaj 11, Sector 5,

cod poștal 050883, București

Tel.: (031) 425.40.40, Fax: (031) 425.40.41

E-mail: redactia@versamedia.ro

abonamente@versamedia.ro

www.versamedia.ro

Copyright © 2016 VERSA MEDIA S.R.L.

All rights reserved. For total or partial reproduction, and in any form, printed or electronic, or distribution of materials published is required only with the written consent of the publisher.

The responsibility of original content of published articles belongs to original authors. Every interviewed person responds entirely for their statements. Also the buyers of advertised space are responsible for information included in their advertisements.

ISSN 2344-2379

e-ISSN 2537-110X

ISSN-L 2344-2379

Elsevier Bibliografic Database: SCOPUS

CASE REPORT

- 161** Curative anterior pelvic exenteration for pelvic recurrence after irradiated, surgically treated cervical cancer. A case report and literature review
 Nicolae Bacalbașa, Irina Bălescu
- 166** Asherman's syndrome after an uncomplicated cesarian section
 Claudia Mehedintu, Oana Ionescu, Ana Maria Rotaru, Marina Antonovici, Mihaela Plotogea, Costin Berceanu, Simona Vladareanu, Elvira Bratila
- 169** A very rare cause of hemoptysis and chest pain lung endometriosis. A case report.
 Ionela Belaconi, Elena Dantes, Claudia Lucia Toma

GENERAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY

- 172** Hemolytic disease by isoimmunization in Rh and ABO systems in newborns. A clinical study
 Corina Frecus, Ioana Husaru, Adina Ungureanu, Laurentiu Tony Hangan
- 177** Classical curettage versus Karman aspiration curettage. A comparative study.
 Lucian Serbanescu

REVIEW

- 180** New molecular markers for cervical precancer detection optimization. Immunocytochemistry test: p16 / Ki-67 dual staining (CINtec PLUS test)
 Alexandru Baros, Mihaela Badea, Roxana Bohiltea, Monica Cirstoiu
- 183** The influence of gestational diabetes on fetal development. A review
 Elvira Brătîlă, Gabriela Iacob, Diana-Elena Comandașu, Mihai Mitran, Monica Cîrstoiu, Roxana Bohâlțea, Costin Berceanu, Claudia Mehedintu, Simona Vlădăreanu
- 187** Is it time to reconsider fetal growth charts?
 Andrei Vlad Traistaru, Radu Vladareanu, Simona Vladareanu
- 190** Early ultrasound evaluation for fetal cardiovascular congenital abnormalities
 Costin Berceanu, Elvira Brătîlă, Sabina Berceanu, Ioana Andreea Gheonea, Monica M. Cîrstoiu, Claudia Mehedintu, Răzvan Ciorte, Octavian Munteanu, Roxana Bohâlțea, Irina Horhoianu, Simona Vlădăreanu

- 198** Psoriasis during pregnancy. A literature review
 Isabela Sarbu, Cristina Mitran, Madalina Mitran, Daniela Mihaila, Dan Navolan, Tony L. Hangan, Mircea Tampa, Vasile Benea, Simona-Roxana Georgescu

- 202** Krukenberg tumors. Prognostic factors, surgical treatment and survival benefit. A literature review
 Olivia Ionescu, Irina Balescu, Nicolae Bacalbasa

- 205** Evidence based considerations regarding the new ACOG labor guidelines
 Anca-Daniela Stănescu, Dumitrescu Andrei-Casimir, Romina-Marina Sima, Liana Pleș

- 208** Non-invasive prenatal testing for rare chromosomal anomalies
 C. Coroleucă, C.A. Ionescu, L. Pleș, M. Dimitriu, M. Banacu, I. Popescu, L. Șerbănescu

- 211** Ultrasound during labour
 C.A. Ionescu, C. Coroleucă, L. Pleș, M. Dimitriu, M. Banacu, R. Viezuină, R. Bohiltea

New molecular markers for cervical precancer detection optimization. Immunocytochemistry test: p16/Ki-67 dual staining (CINtec PLUS test)

Alexandru
Baros^{1,2},
Mihaela
Badea³,
Roxana
Bohiltea^{1,2},
Monica
Cirstoiu^{1,2}

1. "Carol Davila" University
of Medicine and Pharmacy,
Bucharest, Romania
2. Emergency University
Hospital,
Obstetrics&Gynecology,
Bucharest, Romania
3. Micomi Clinic Bucharest,
Romania

Correspondence:
Dr. Alexandru Baros
e-mail: alexandrubaros@
yahoo.com

Abstract

The dual immunostaining of cervical cytology p16/Ki-67 which combines a high sensitivity with a high specificity is the solution that has been developed in recent years for cervical precancer detection optimization. The test is a double immunocytochemistry staining performed simultaneously in the same cell for p16 - transforming infection marker and Ki67, a proliferation marker. This immunocytochemistry test is intended to optimize the surveillance or screening of young patients with cytology results: atypical squamous cells of undetermined significance with high risk human papilloma virus or low-grade squamous intraepithelial lesions, thus avoiding colposcopies and any invasive gesture at nulliparous, reducing the anxiety of patients linked to the indication of colposcopy and ultimately reducing diagnosis costs. Each year there are 500.000 new cases of cervical cancer detected worldwide and the average of 5 years survival rate is only 50%, thus including the CINtec PLUS test in cervical cancer screening programs may be seen as an innovative strategy an can provide real benefit to clinicians and patients as it helps identifying underlying disease and establish who should proceed to further procedures.

Keywords: cervical detection, immunocytochemistry, colposcopy

Introduction

Cervical cancer is the most common gynaecological cancer that affects women. The majority of cases occur in relation to the infection with human papilloma virus (HPV).

In the evolution of HPV infection to neoplasia there are also involved factors related to the host⁽¹⁾.

For women infected with high-oncogenic HPV subtypes, cervical squamous cell carcinoma risk is 189 times higher and cervical adenocarcinoma risk is 110 times higher as compared to women without HPV infection⁽¹⁾.

Increasingly more data suggest that HPV oncoproteins have a critical role in continuous cellular proliferation. Unlike other HPV serotypes, the oncogenes have the capacity to integrate in the human genome⁽¹⁾.

Consequently, E1 and E2 early replication oncoproteins will facilitate viral replication in the cervical cells. Thus, these proteins synthesized in considerable amounts in early phases of HPV infection, will induce cytological alterations evidenced by Pap Test. These can be followed by the amplification of viral replication and normal cells transformation to tumour cells, a process that involves E6 and E7 viral oncoproteins⁽¹⁾.

The international guidelines for practice in cervical cancer prevention have been improved for the last two decades, at short periods of time, as molecular mechanisms of carcinogenesis are developing, new studies are being conducted and new clinically significant technologies are expanding⁽²⁾.

Because of the HPV infection, which is both widespread and in most cases spontaneous transient, the HPV test, although very sensitive, has a limited specificity for precancer and cancer, being associated with an inevitable number of false positive results⁽²⁾.

The solution that has developed in the last few years consists in the use of more specific molecular markers in secondary for cervical precancer, combining high sensitivity with a high specificity of which the most studied is the p16/Ki-67 dual immunocytochemical staining (Figure 1).

The sensitivity of p16/Ki67 double staining

The published studies show that the sensitivity of p16/Ki-67 double staining is comparable to that of the HPV testing, but at a significantly higher specificity⁽²⁾.

The cervical intraepithelial neoplasia (CIN)tec test is a double immunocytochemical staining simultaneously

Received:
September 06, 2016
Revised:
October 02, 2016
Accepted:
October 22, 2016

in the same cell for p16, a marker of transforming HPV infection and for the Ki-67 proliferation marker. It identifies a disorder of the cell cycle by inactivating the retinoblastoma 1 protein located in the proliferating cell, this mechanism resulting from the E7 oncogene expression of a high-risk HPV. The overexpression of p16 is therefore an indirect means of diagnosing not only high-risk HPV infection, but also the E7 oncoprotein expression related to a transforming infection. P16 is present in almost all forms of grade 2 CIN(2+) and cervical cancers⁽²⁾.

The immunocytochemical evaluation is performed in cytological slides displayed separately from those stained by Pap standard method for usual morphological evaluation.

They may be sampled conventionally or by liquid medium techniques, or may the residual liquid from the initial cytology may be used⁽²⁾.

Technically, a kit consists of a cocktail of primary antibodies p16INK4 - mouse specific primary monoclonal antibody (clone E6H4) and Ki - 67, rabbit specific primary monoclonal antibody, followed by the application of two different reagents and two differently stained chromogenic substrates (DAB brown coloured and Fast red, red coloured)⁽²⁾.

Due to the haematoxylin counterstain of the preparation, sometimes the morphology can also be measured. The presence of one or more double stained cervical epithelial cells defines a positive result of CINtec PLUS test, irrespective of the morphology interpretation⁽²⁾.

By using p16/Ki-67 immunocytochemical testing the medical conduct of screening or surveillance of young patients with cytological results such as low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) or positive high-risk HPV atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) is optimized, unnecessary colposcopy is avoided (indications for colposcopy are restricted to positive CINtec PLUS cases), thereby limiting nulliparous invasive gestures and negative CINtec PLUS results are monitored every 12 months by cytological and viral testing⁽³⁾.

The sensitivity of a single cytology test for the detection of CIN2 + or high-grade CIN (HGCIN) is unsatisfactorily low. To improve sensitivity, testing for the presence of high risk HPV has been proposed as an alternative or an auxiliary instrument for cervical cancer screening⁽⁴⁾.

Higher sensitivity for HPV testing

Numerous studies have shown that HPV testing offers a high sensitivity for CIN2+⁽⁵⁻⁷⁾.

However, the specificity of screening women for HGCIN with HPV testing is limited because most HPV infections are transient and only a small percentage of infections persist and may progress into transforming infections and HGCIN (11). Given the high prevalence of HPV infections in younger women, currently, HPV testing is not recommended for screening women younger than 30⁽⁸⁾.

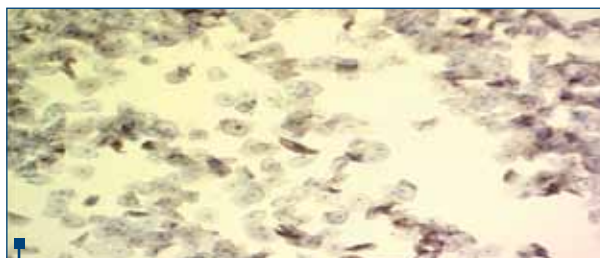


Figure 1. P16/Ki-67 double staining (personal collection, Micomi Clinic)

In order to estimate the sensitivity and specificity of p16/Ki-67 dual staining and to compare it with Pap testing, a study (Primary ASC-US and LSIL Marker Study- PALMS Study) was conducted. The study included a routine screening of European population for cervical cancer in women age 18 or 18+, and HPV testing of women age 30 or 30+⁽⁹⁻¹¹⁾.

A number of 196 women aged 18 or even older, subject to routine cytology - based cervical cancer screening were enrolled in hospital - based screening cancers in Belgium, France, Germany, Italy and Spain.

Screening exclusion criteria used: pregnancy and previous hysterectomy. All subjects in the study gave their written informed consent. All women were subject to Pap cytology, p16/ Ki-67 double staining and HPV testing⁽¹¹⁾.

All subjects with abnormal Pap results (ASC-US or ASC-US +) or a positive p16/Ki-67 dual staining cytology result and/or a positive high-risk HPV test result were referred for colposcopy, except when the HPV was the only positive test in women younger than 30 years. Subjects with negative results in all tests completed the study upon receipt of results⁽¹¹⁾.

A total of 27.349 women participating in routine screening for cervical cancer were enrolled into the study: 12.226 (44.7%) in Germany, 5.250 (19.2%) in Italy, 4.034 (14.8%) in France, 3.929 (14.4%) in Spain and 1.910 (7.0%) in Belgium. The screened population average age was 39.9 years⁽¹¹⁾.

Among the 27.248 subjects with all three tests performed, the overall prevalence of positive dual - stained cytology results was 5,4%, similar to ASC-US+ prevalence and half of HPV prevalence (10.7%). Positivity rate was overall higher in women group aged 18-29 years, as compared to women in their 30's. The prevalence rate of positive dual-stained cytology was comparable to ASC-US+ and approximately half of HPV prevalence rate in both age groups⁽¹¹⁾.

PALMS study data show that dual stained cytology can offer both high sensitivity and specificity for the detection of HGCIN in a single test⁽¹²⁾.

The new immunocytochemistry test offers the clinicians an alternative to the classical recommendation of colposcopy, and the possibility to optimize the medical attitude in screening or surveillance of young patients with ASC-US cytology results and high- positive risk HPV or LSIL and of patients of any age with normal cytological smear, associated with high-risk HPV positive test.

The positive test result is a referral for colposcopy evaluation, and the negative test allows for the maintenance of a cytological surveillance⁽²⁾. The dual immunostaining of cervical cytology p16/Ki-67 thus selects from the patients who are likely to hide or develop serious illness of the cervix in the future, those who really need colposcopy, allows avoiding invasive gestures to nulliparous, helps reduce anxiety at patients related to the indication of colposcopy and ultimately to lower costs of diagnoses⁽²⁾.

Conclusions

Each year there are 500.000 new cases of cervical cancer detected worldwide and the average 5 years survival rate is only 50%, thus including the CIntec PLUS test in cervical cancer screening programs may be seen as an innovative strategy and can provide real benefit to clinicians and patients as it helps identifying underlying disease and establish who should proceed to further procedures. ■

References

- Hoffman B, Schorge J, Schaffer J, Halvorson L, Bradshaw K, Cunningham F, Vlădăreanu R. Williams Gynecology. 2nd Ed., Bucharest, 2015, p. 769-71.
- Micomi Clinic, Available from URL: http://www.clinicamicomi.ro/index.php?option=com_content&view=article&id=121&Itemid=116
- Nanda K, McCrory DC, Myers ER. et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2000, 132(10), 810-9.
- Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2011, 103(5), 368-83.
- Arbyn M, Ronco G, Anttila A. et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 2012, 30(Suppl 5), F88-F99.
- Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Jr, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol* 2011, 12(9), 880-90.
- Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L. et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet* 2007, 370(9601), 1764-72.
- Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodriguez I. et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007, 357(16), 1579-88.
- Naucler P, Ryd W, Törnberg S. et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007, 357(16), 1589-97.
- Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F. et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2010, 11(3), 249-57.
- Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R. et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst* 2008, 100(7), 513-7.
- Saslow D, Solomon D, Lawson HW. et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol* 2012, 137(4), 516-42.