



Il test HPV: prelievo e aspetti pratici

Anna Gillio Tos

*Centro Unificato per lo Screening Cervico Vaginale
Ospedale S. Giovanni Antica Sede - Torino*

Epidemiologia dei Tumori - Università di Torino

Innovazioni nello Screening Cervicale

Raccomandazioni

1. creazione di **Centri Unificati** per lo Screening cervicale
 - ⇒ Centri Riferimento
 - ⇒ DGR 12 – 9941 del 3/11/2008
adozione modello Centro Unico
 2. allestimento di **Studi di Fattibilità ed Efficacia** → **Studi Pilota**
applicazione del **test HPV** come test primario di screening
 3. selezione del **test analitico per HPV** in accordo con le
Linee Guida Europee
 4. introduzione del **test HPV** come **test primario** di screening
Rapporto HTA → **DGR 21-5705 del 23 aprile 2013**
-

1. creazione di **Centri Unificati** per lo Screening cervicale

Centro Unificato Screening Cervico-vaginale (2009) *Resp. Prof A. Sapino*

- Compartecipazione attiva dei **patologi**
- Disponibilità del personale alla **mobilità**
- Disponibilità delle Aziende Sanitarie alla **condivisione del personale**

AO San Giovanni Antica Sede

A.S.L. TO1	A.P. Osp. Martini <i>Dott. Laura Viberti</i>
A.S.L. TO2	A.P. Osp. Maria Vittoria <i>Dott. Stefano Taraglio</i>
	A.P. Osp. S. Giovanni Bosco <i>Dott. Sergio Coverlizza</i>
A.O. OIRM-S.Anna	A.P. Osp. Sant'Anna <i>Dott. Bruno Ghiringhello</i>
A.O.U. San Giovanni Battista	A.P. Osp. SGAS <i>Dott. Ester Berardengo</i>
	A.P. Osp. Molinette <i>Prof. Gianni Bussolati</i>

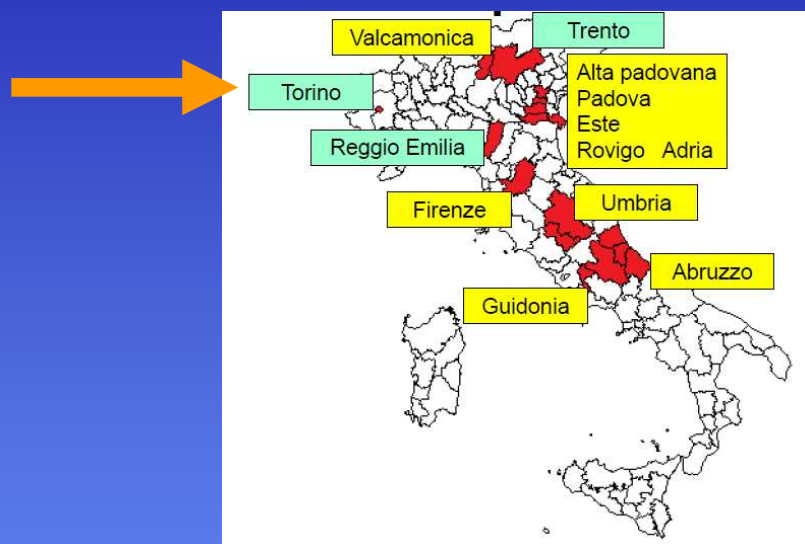


Pap Test
Citologia

HPV Test
Molecolare

- ↗ livelli di qualità analitica
- ↗ monitoraggio e previsione delle classi diagnostiche
- ↗ ottimizzazione della gestione del rischio

2. allestimento di **Studi di Fattibilità ed Efficacia** per valutare applicazione del **test HPV** come **test primario** di screening



Studi Pilota HPV

Confermata adeguatezza del
Test HPV come test primario
per screening cervicale

Efficacia nella prevenzione dei tumori invasivi del collo dell'utero:

Elevata sensibilità per lesioni cerv clinicamente significative

Test clinicamente validati per il DNA di ceppi HPV oncogeni con un protocollo di screening appropriato sono più sensibili della citologia

Effetti indesiderati

Minore specificità con rischio di sovra-diagnosi e sovra-trattamento di lesioni spontaneamente regressive

→ si può ovviare con **trriage**

3. Selezione del **test analitico per HPV** in accordo con **Linee Guida Europee**

Quale Test molecolare ?



Test Validati
secondo linee guida europee

*Devono essere utilizzati test per il DNA di HPV oncogeni
validati in trials per sensibilità e specificità per lesioni di alto grado*

*Int. J. Cancer: 124, 516–520 (2009)
© 2008 Wiley-Liss, Inc.*

FAST TRACK

Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older

Chris J.L.M. Meijer^{1*}, Johannes Berkhof², Philip E. Castle³, Albertus T. Hesselink¹, Eduardo L. Franco⁴, Guglielmo Ronco⁵, Marc Arbyn^{6,7}, F. Xavier Bosch⁸, Jack Cuzick⁹, Joakim Dillner¹⁰, Daniëlle A.M. Heideman¹ and Peter J.F. Snijders¹

Selezione del test analitico per HPV

Il test deve permettere la determinazione
nel campione dei **ceppi HPV oncogeni**

*Bouvard V. et al. WHO IARC in Cancer Monograph Working Group.
Lancet Oncol. 2009;10:321–322.*



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

Selezione del test analitico per HPV

- **Riproducibilità** →

Capacità di ottenere
RISULTATI SOVRAPPONIBILI
in sedute di analisi differenti e
in laboratori differenti

- **Sensibilità**
(NO falsi neg) →

Capacità di individuare come **POSITIVI**
tutti i soggetti **"CON PATOLOGIA"**

- **Specificità**
(NO falsi pos) →

Capacità di individuare come **NEGATIVI**
i soggetti **"SANI"**

Selezione del test analitico per HPV

Trials randomizzati controllati **1°** Round di Screening : HPV vs Citologia

Studio	Test primario Braccio sper.	Test HPV	Gestione donne HPV+	Sensibilità relat. (RR) HPV vs Cit
SVEZIA SWEEDSCREEN Età 30-69	HPV e Citol. conv.	GP5/6 PCR EIA	Triage Citologico	1.42 (1.06, 1.91)
OLANDA POBASCAM Età 29-56	HPV e Citol. conv.	GP5/6 PCR EIA	Triage Citologico	1.64 (1.17, 2.31)
INGHILTERRA ARTISTIC Età 20-64	HPV e LBC	HC2	Triage Citologico	1.47
ITALIA NTCC fase 1 Età 35-60	HPV e LBC	HC2	Colposcopia	1.43 (1.00, 2.04)
ITALIA NTCC fase 2 Età 35-60	solo HPV	HC2	Colposcopia	1.92 (1.28, 2.87)
CANADA CCCaST Età 30-69	HPV e Citol. conv	HC2	Colposcopia	1.69 (0.83, 3.45)
FINLANDIA FINNISH RCT Età 30-60	solo HPV	HC2	Triage Citologico	1.43 (1.12, 1.84)

Performance test HYBRID CAPTURE 2 (HC2) in screening cervicale

- **Riproducibilità** → **alta riproducibilità intra ed inter – laboratorio 90%**
Carozzi et al. Am J Clin Pathol 2005;124:716-721
- **Sensibilità**
(NO falsi neg)
 - 1. **analitica** 1 pg/ml = 5000 copie HPV
 - 2. **clinica** > 95 % per CIN2+ (> 40% citologia)
- **Specificità**
(NO falsi pos)
 - 1. **analitica** > 97% per HPV ad alto rischio
 - 2. **clinica** ~ 90 % per CIN2+ (96,3% citologia)

Selezione del test analitico per HPV

Nuovi Test Validati

secondo linee guida europee

*Devono essere utilizzati test per il DNA di HPV oncogeni
validati in trials per sensibilità e specificità per lesioni di alto grado*

*Int. J. Cancer: 124, 516-520 (2009)
© 2008 Wiley-Liss, Inc.*

FAST TRACK

Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older

Chris J.L.M. Meijer^{1,2}, Johannes Berkhof³, Philip E. Castle⁴, Albertus T. Hesselink⁵, Eduardo L. Franco⁶, Guglielmo Ronco⁷, Marc Arbyn^{8,9}, F. Xavier Bosch⁸, Jack Cuzick⁸, Joukim Dillner¹⁰, Danielle A.M. Heideman¹ and Peter J.F. Snijders¹

Sensibilità per CIN2+ : > 90% Hybrid Capture 2

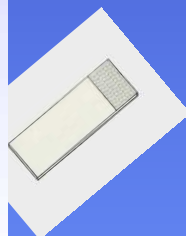
Specificità per CIN2+ : > 98% Hybrid Capture 2

4. Applicazione DGR 21-5705 : Test HPV come test primario

In Piemonte

Test primario screening HPV:

Hybrid Capture 2



2 prelievi

STM + striscio convenz

Restituire: STM residui
Scatole verdi vetrini HPV



1 prelievo

PreservCyt - ThinPrep
(Hologic)



4. Introduzione del **test HPV** come **test primario** di screening

DGR 21-5705 del 23 aprile 2013

donne **30** – 64 anni



Introduzione del **test HPV** come **test primario** di screening

Il nuovo algoritmo

1. Rovesciare attuale algoritmo:



Pap Test – Test HPV – colposcopia

Test HPV – Pap Test – colposcopia



*Triage con Test filtro per ottenere
valori accettabili di specificità*

2. Attesa di nuovi biomarcatori di specificità

mRNA

genotipizzazione,

Proteina p16

Over-espressione oncogeni

Introduzione del **test HPV** come **test primario** di screening

Il nuovo algoritmo



Stratificazione popolazione in 3 categorie

- 1. Donne a rischio di patologia bassissimo** ↔ **HPV neg**
 - 2. Donne a rischio di patologia medio** ↔ **HPV pos
Cito neg**
 - 3. Donne a rischio di patologia alto** ↔ **HPV pos
Cito pos (ASC-US +)**
-

Il prelievo per il Test HPV: l'accoglienza dell'ostetrica

RICORDARE CHE :



- più del 70% delle donne contrae infezione da HPV nel corso della vita
AVERE INFEZIONE HPV NON E' UN FATTO GRAVE
- generalmente è un'infezione che **regredisce** e guarisce da sola senza conseguenze: solo in una piccola percentuale persiste e dà lesioni
- si propone un **test molecolare** che è risultato **più sensibile e più efficace** del Pap Test nell'identificare lesioni di alto grado, favorendone una identificazione più precoce rispetto al Pap Test
- che il **test HPV** ha dimostrato di **prevenire i carcinomi invasivi** con efficacia 60-70% maggiore rispetto al Pap Test
- l'intervallo di **5 anni è sicuro** perché è il rischio di avere una lesione dopo un esito HPV negativo in questo intervallo è bassissimo
- **in caso di esito HPV positivo è molto importante sottoporsi ai controlli suggeriti nei tempi indicati**

Studi di Fattibilità ed Efficacia → Progetto Pilota HPV Torino

Donne HPV pos /Cito neg – (rischio intermedio)

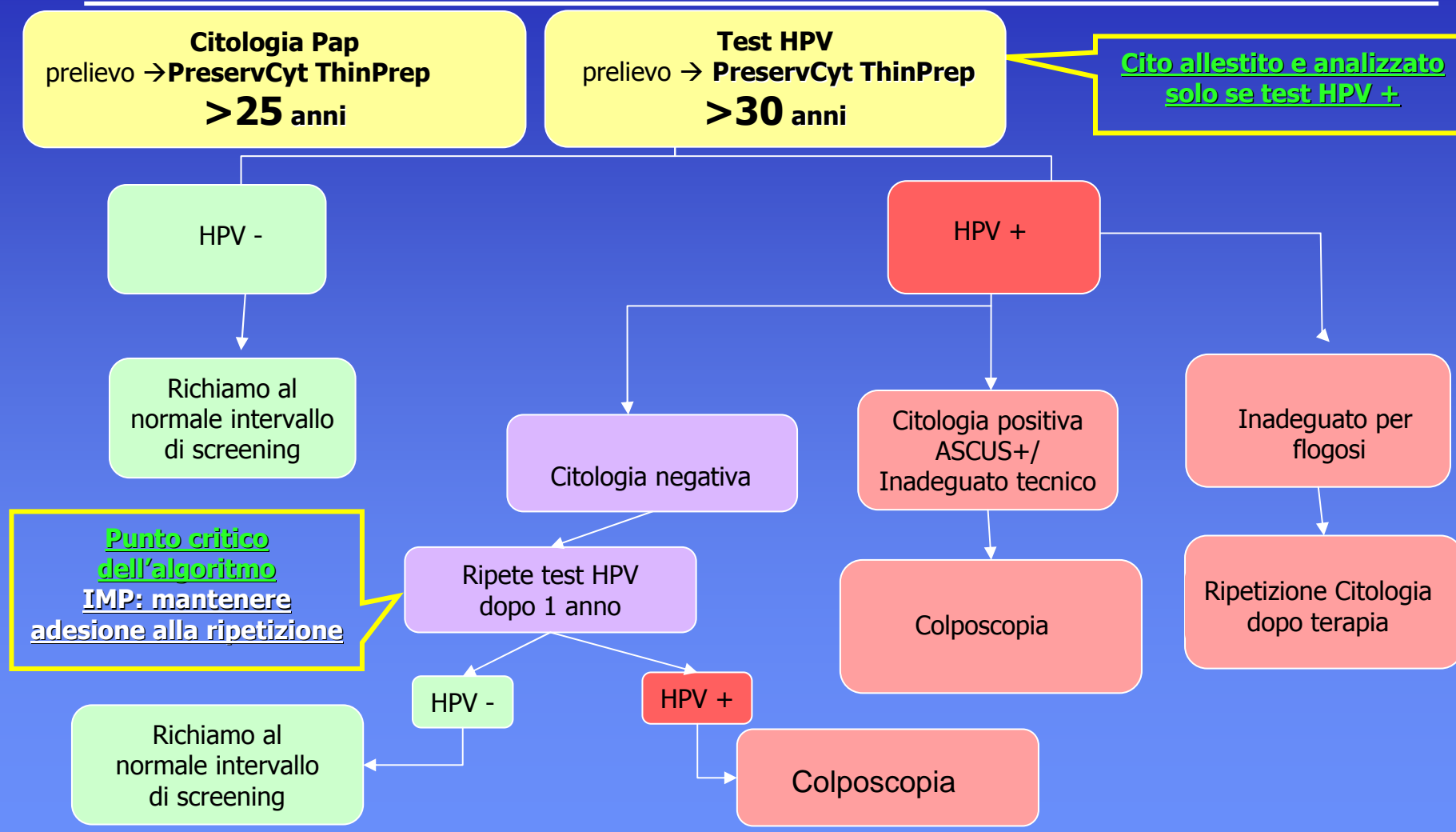
Adesione alla ripetizione test HPV dopo 1 anno
(Mar 2010 – Feb 2013)

Centro	Adesione ripetiz a 1 anno	HPV + ripetiz a 1 anno	HPV neg ripetiz a 1 anno
Torino	708/780 90.7%*	411/708 58.1%	297/708 41.9%

* media Italiana 75-80%

- CIN1 : 17 casi
- CIN2 : 11 casi
- CIN3 : 6 casi

Applicazione **DGR 21-5705** : Test HPV come test primario

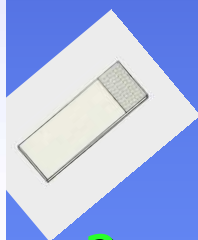


Applicazione **DGR 21-5705** : Test HPV come test primario

In Piemonte



analisi molecolari e di triage citologico saranno **centralizzate** in due centri :
Torino e **Borgomanero (NO)**



2 prelievi

STM + striscio convenz

Test primario screening HPV:
Hybrid Capture 2



1 prelievo

PreservCyt - ThinPrep
(Hologic)



Il prelievo per il Test HPV: sistema di raccolta e trasporto

PreservCyt Thin Prep
(Hologic)



Conservazione : 4 °C – 30 °C

Distribuzione :

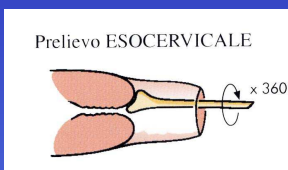
ThP + spatole e cytobrush
sia per Test HPV che per Citologia
tramite magazzino di riferimento TO1 e TO2

Etichette con codici a barre
2 tipologie diverse per Test HPV e per Citologia
tramite fattorini Centro Unificato - SGAS

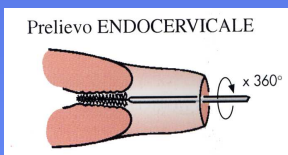
Il prelievo ThP per il Test HPV

IMPORTANTE

per adeguatezza prelievo



- Risciacquare la spatola di Ayre nel liquido Preservcyt **vigorosamente 10 volte**.
- Poi **eliminare** la spatola.



Nello stesso contenitore:

- Risciacquare il **cytobrush** roteandolo nel liquido Preservcyt **vigorosamente 10 volte** e **premendo contro le pareti interne** del contenitore
- Poi **eliminare** il cytobrush.

Il prelievo: conservazione e flusso operativo



Chiudere il contenitore **avvitando bene il tappo** in modo possibilmente che la linea nera sul tappo combaci con quella di riferimento sul contenitore

e **immediatamente**

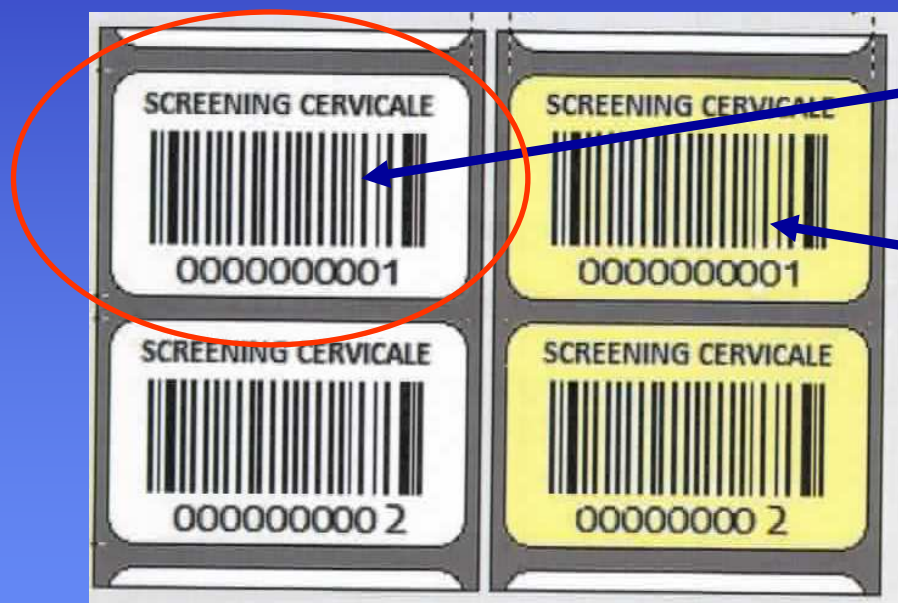


dotarlo dell' **etichetta con codice a barre** posizionata **verticalmente** da abbinare all'anagrafica della donna

Il campione può essere **conservato a 15 °C – 30 °C** e analizzato **entro 6 settimane** dal prelievo

Il prelievo: Etichette codice a barre

Per HPV TEST : numerazione inizia con "0"



BIANCA

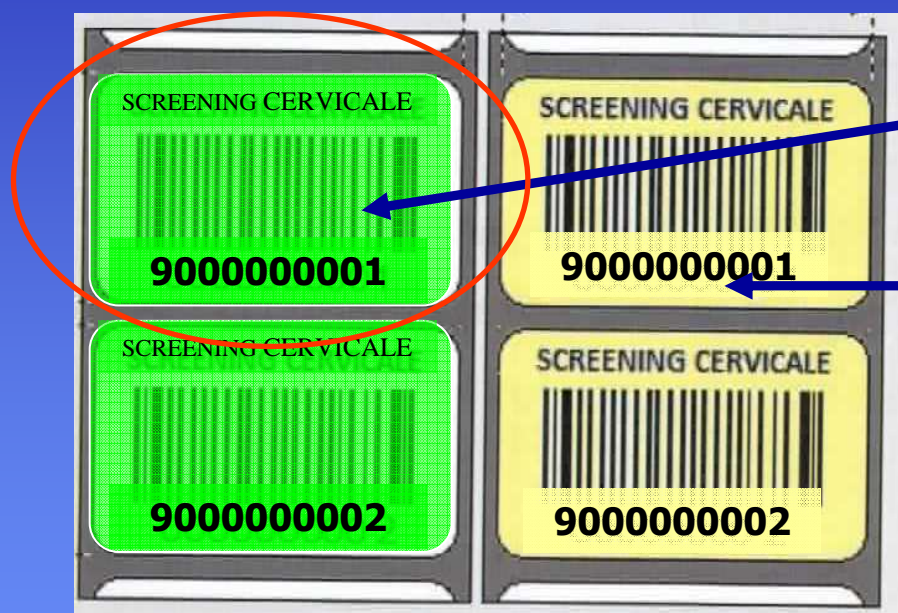
apporre verticale sul ThP

GIALLA

- normalmente NON USARE
- solo se EMERGENZA INFORMATICA, apporre su agenda cartacea

Il prelievo: Etichette codice a barre

Per **CITOLOGIA** Pap test : numerazione inizia con "9"



VERDE

apporre verticale sul ThP

GIALLA

- normalmente NON USARE
- solo se EMERGENZA INFORMATICA, apporre su agenda cartacea

Il prelievo: Etichette codice a barre

Lettores codici a barre



E' indispensabile provarlo

ISTRUZIONI

- Inserire cavo da un capo nel lettore e dall'altro nella porta USB del PC.
- Aprire su pc
Start → programmi → accessori → blocco note (o word pad) e
posizionare il cursore del mouse sulla pagin
- Posizionare il lettore su etichetta con codice a barre e azionare
pulsante azzurro.
- Controllare che il codice a barre venga trasferito sullo schermo.
- In caso di problemi o non funzionamento comunicarlo a
piera.vicari@cpo.it o 011 633 3865

N.B. Conservare la scatola

Il prelievo per il Test HPV: sistema di raccolta e trasporto

PreservCyt Thin Prep
(Hologic)

Conservazione : 4 °C – 30 °C

Distribuzione :



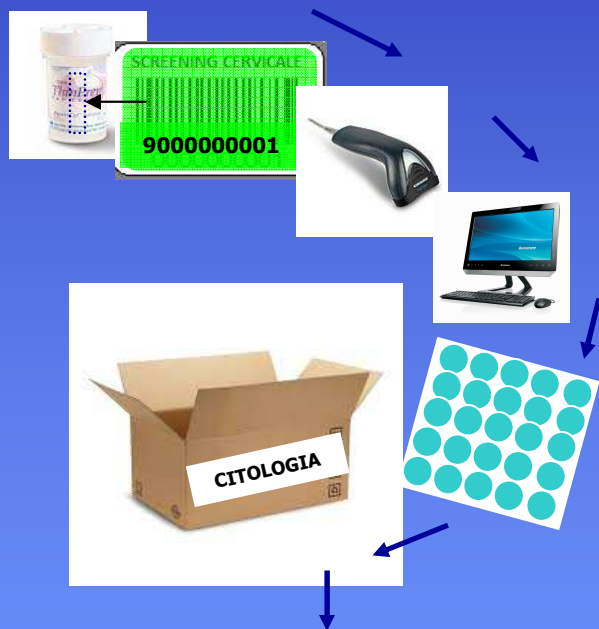
Prima fornitura **SOLO** per i primi **TEST HPV**



- **25** ThP, spatole e cytobrush
- **25** coppie di etichette codice a barre
- **1** lettore di etichette codice a barre
- Istruzioni per prova e uso lettore di etichette codice a barre

Flusso operativo

Citologia Pap prelievo PreservCyt ThinPrep



Lab Citologia
Anatomia Patologica – Osp S. Anna
Corso Spezia 60 – 5° Piano5

Test HPV prelievo >30 PreservCyt ThinPrep



Lab Molecolare
Centro Unificato Screening C.V. – SGAS
Via Cavour 31 – 2° Piano



Flusso operativo : preparazione di 2 pacchi

1. ThP etichetta codice a barre bianca + lista → **SCREENING HPV**

- I campioni in ThP da inviare a **Lab Molecolare Centro Unificato SGAS**
- esecuzione del **test HPV**
- selezione HPV positivi
 - invio a **Lab Citologia S.Anna** per allestimento vetrini in strato sottile e **colorazione Pap**
 - lettura citologica al **Centro Unificato SGAS**

2. ThP etichetta codice a barre verde + lista → **CITOLOGIA**

- I campioni in ThP da inviare a **Lab Citologia S.Anna**
 - allestimento vetrini in strato sottile e **colorazione Pap**
 - lettura citologica al **Centro Unificato SGAS**
-

Flusso operativo

IMPORTANTE

1. **INVIARE SEMPRE** I DATI AL CSI A FINE GIORNATA
 2. **VENERDI' 14/02 INVIARE I DATI
AL CSI ENTRO LE 17**
-

Il test HPV: flusso operativo

Fase 1 Pre-analitica



- * accettazione
- * agitazione su vortex
- * apertura
- * deposizione aliquote in provette



QIAensemble
Decapper System

Fase 2 Pre-analitica



- * lisi cellulare
- * isolamento del DNA (biglie magnetiche)



QIASymphony SP

Fase 3 Analitica



- * Ibridazione con sonde HPV Hybrid Capture 2 (13 ceppi HPV ad alto rischio)



Rapid Capture System

Fase 4 Post-analitica

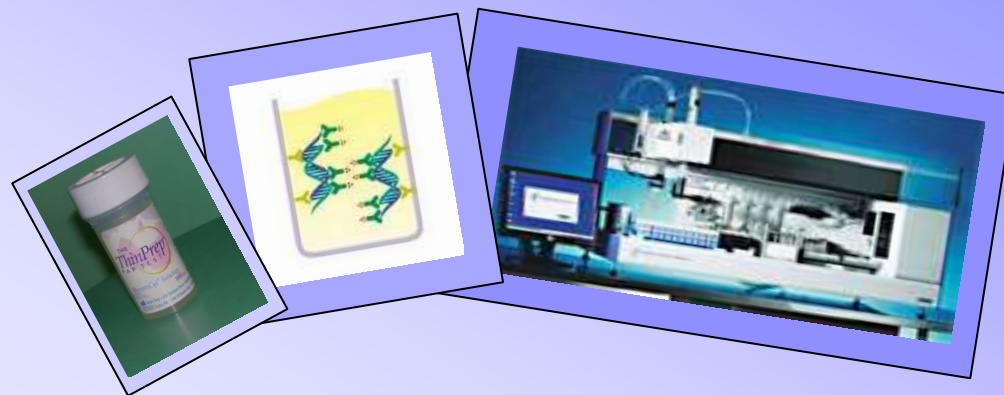
Alta	Dispositivo	Kit/Lit	Valid	Esito	Positivo	Negative
Diagnosi HPV/MS-Q	Diagnosi	1/2/3/4/5	Yes	Yes	481/61	481/61
Linea	Sample/Number/ID	Kit	Non/Kit	Kit	Result	Result
A1	TC	8				
B1	TC	8	8.88	4.16	1.14	NC
C1	TC	73				
D1	MS	4.8				
E1	MS	48				
F1	MS	11	40.88	1.00	1.00	PC
G1	MS/MS/MS	18	8.00	ref/MS	1.14	-
H1	MS/MS/MS	18	8.00	ref/MS	1.14	-
I1	MS/MS	11	10.00	0.00	0.00	-
J1	MS/MS	11	10.00	0.00	0.00	High Risk
K1	MS/MS	11	10.00	0.00	0.00	

- * Interpretazione dei risultati

Invio degli esiti

**350 test al giorno
7500 al mese**

Grazie per l'attenzione



TEST per HPV	STRUMENTAZIONE	DITTA	CERTIFICAZIONE	Materiale testato	DETECTION CEPPI HPV	TYPING HPV	METODOLOGIA
Hybrid Capture 2	Rapid Capture System	Qiagen	FDA CE IVD	DNA	16 18 31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 68		ibridazione e amplificazione segnale chemiluminescenza
Cobas 4800 HPV test	Cobas 4800 System	Roche Molecular Systems	FDA CE	DNA	16 18 31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 66 68	16 18	Real Time PCR fluorescenza
Cervista HPV assay	Termociclature o forno in grado di mantenere le corrette temperature di reazione e Lettore di piastre in fluorescenza	Hologic	FDA CE IVD	DNA	16 18 31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 66 68		chimica Invader®, metodo amplificazione del segnale
Abbott RealTime High Risk HPV	Extraction: <i>m2000sp</i> , <i>m24</i> ; Amplification and Detection: <i>m2000rt</i>	Abbot	CE Non inferiority criteria	DNA	16 18 31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 66 68	16 18	Real Time PCR fluorescenza
Papillocheck	check scanner	Greiner Bio-One	Non inferiority criteria (<i>Mejer IJC 2009</i>)	DNA	16 18 31 33 35 39 45 51 52 53 56 58 59 66 68 70 73 82 alto e basso rischio		PCR, DNA chip hybridization