

HPV e Screening

Le tecniche biomolecolari
ed il controllo di qualità

Francesca Carozzi - CSPO - Firenze



Bar = 100 nm

TEST DI LABORATORIO UTILIZZATI NELLA RICERCA E TIPIZZAZIONE DI HPV

- Southern blotting
- Dot blot
- Filter in *situ* hybridisation
- *In situ* hybridisation
- Hybrid Capture (HC)
- Polymerase chain reaction (PCR)
- *In situ* Polymerase chain reaction

Bethesda 2001

-fornire una breve descrizione del metodo utilizzato
- ...il risultato dovrebbe essere fornito come positivo o negativo per un certo tipo di HPV o classe di HPV
- .. . I tipi specifici di HPV inclusi nel metodo possono essere listati

HPV AD ALTO RISCHIO

Degli oltre 35 tipi di HPV ritrovati nel tratto genitale:

- **15** sono stati considerati come tipi ad alto rischio in relazione alla loro associazione con carcinomi invasivi:

16.18.31.33.35.39.45.51.52.56.58.59.68.73.82

- **3** come probabili HR: 26,53, 66

- **12** come a basso

rischio:6,11,40,42,43,44,54,71,70,72,81 cp6108..

Munoz N, Bosch X et al , 2003

HPV HR DNA TEST

I valori di OR dei tipi di HPV ad alto rischio e la loro combinazione nelle coinfezioni, indica chiaramente che testare il gruppo di HPV ad alto rischio può essere sufficiente nel contesto di protocolli clinici e di screening.

PROGRAMMI DI SCREENING

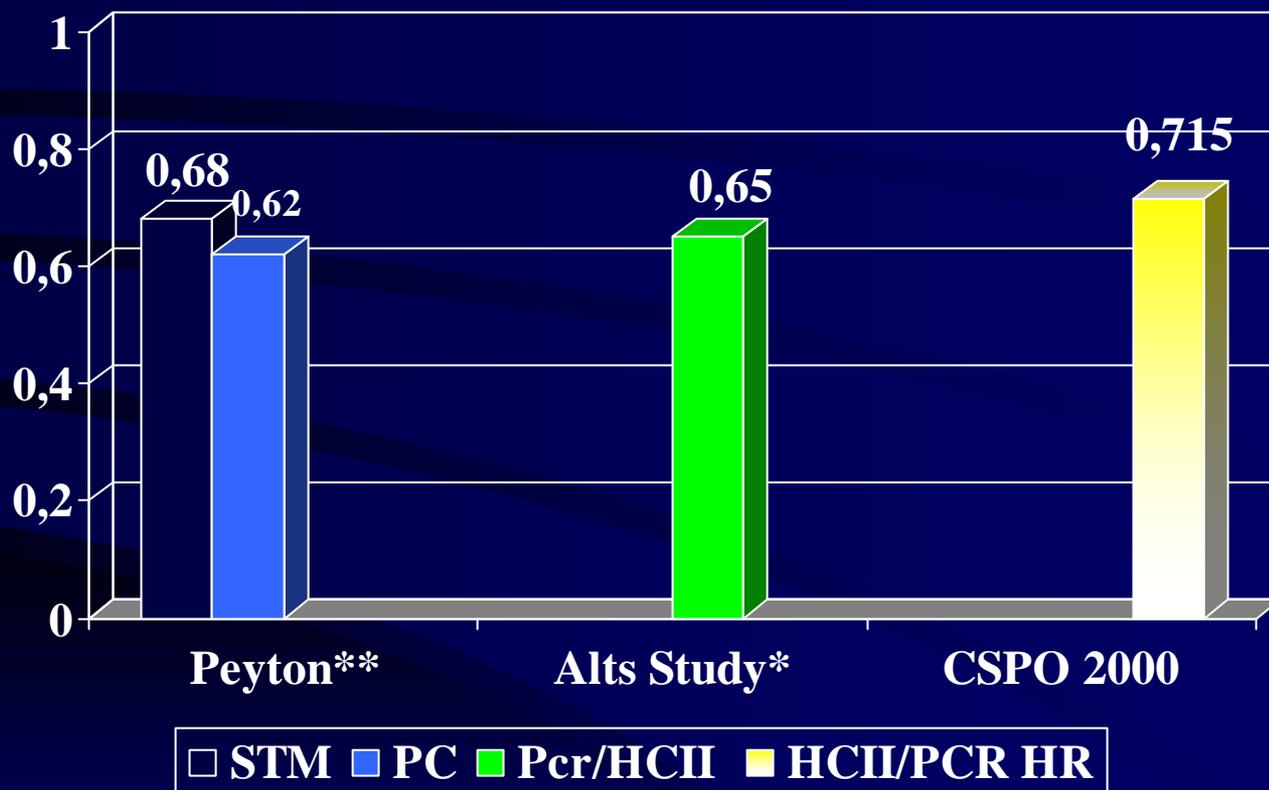
CARATTERISTICHE DEL METODO

- Altamente sensibile e specifico
- Determinazione di un ampio spettro di HPV HR
- Minime quantità di campione
(prelevato in maniera non invasiva)
- Alta riproducibilità intra/interlaboratorio
- Possibilità di eseguire molti test
- Semiautomatico o interamente automatico
- Costo limitato

Current technology for HPV DNA detection of genital infections

I test validati in trials di ampie dimensioni e in studi epidemiologici sono HC2 e metodi in PCR basati sull'uso di primers consensus (MY09/11 E GP5/6)

Kappa di concordanza tra HCII e PCR. (per i soli tipi di HPV presenti nella Sonda B)



* Risultati di: ALTS study- J Nat Canc Inst 2000

* Risultati di: Peyton C.L. et al, J Clin Micr 1998

HCII 1 pg/ml *versus* PCR MY09/MY11

ANALISI CASI DISCORDANTI

Buona concordanza tra i due metodi nella individuazione di HPV dna.

Una piccola % di donne con HCII positiva alla sonda ad alto rischio erano positive a tipi di HPV non inclusi come probes nel metodo.

“Questi dati , aggiunti ad una analisi più dettagliata dei tipi specifici suggerisce che HCII determina tipi di HPV che non sono inclusi nella combinazione di probes (6, 11,40,42,53,55,66,70, MM4, MM7, MM8 e MM9).”

HPV testing for triage LSIL:baseline data from ALTS study- J Nat Canc Inst :92 (5),2000



'Restricted cross-reactivity of HC2 with non oncogenic HPV'

Castle P.E.: Cancer Epidemiology, Biomarkers & prevention 2002

- 954 campioni testati
 - con HC2 (sonda HR)
 - PCR (My09/11)
- 535 erano positivi ai tipi ad alto rischio → 84% positivi in HC2
- 131 (13.7%) campioni positivi per i tipi non oncogenici → 39/131 (29.8%) positivi con la sonda HR di HC2

Restricted cross-reactivity of HC2 with non oncogenic HPV'

Castle P.E.: 2002

- Valutazione della cross-reattività sulla performance clinica del test:
- Sensibilità e specificità di HC2 attuale
- Sensibilità e specificità teorica (se non si avesse la cross-ibridazione)

Restricted cross-reactivity of HC2 with non oncogenic HPV'

Castle P.E.: 2002

	HC2 Attuale		HC2 Teorica	
	Cin2+	Cin3+	Cin2+	Cin3+
sensibilità	87.9%	94.1%	84.3%	89.6%
Specificità	88.1%	87.6%	92.9%	89.2%
Invio colpo	13.2%		11.7%	

Youndex index : differenze non significative

SENSIBILITA' ANALITICA

- PCR : sensibilità 100 genomi di HPV, con un range negli studi che varia da 1-500

- HCII: non sono stati pubblicati dati sulla sensibilità analitica di HCII.

Cut-off di 1pg/ml di DNA virale che corrisponde a circa 5000 genomi di HPV. Comunque questo non è il livello minimo di determinazione, ma una performance clinica.

Cuzick, Health Technology Assessment 1999

SENSIBILITA' E SPECIFICITA' ANALITICA

- **SENSIBILITA' ANALITICA:** la proporzione di donne HPV pos correttamente individuate da un test
- **SPECIFICITA' ANALITICA :** la proporzione di donne HPV HR negative che sono correttamente identificate da un risultato negativo

SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

- **SENSIBILITA' CLINICA:** la proporzione di donne con malattia (lesioni \geq cin2) che sono correttamente identificate da un test HPV positivo
- **SPECIFICITA' CLINICA:** la proporzione di donne senza lesioni \geq cin2 che sono che sono correttamente identificate da un risultato negativo

SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

- The clinical sensitivity of an HPV test is not directly tied to its analytical sensitivity

PERSISTENZA DEL VIRUS

Studi di follow-up indicano che per lo sviluppo, il mantenimento e la progressione di neoplasia intraepiteliale cervicale è necessaria la continua presenza del DNA di HPV



Le donne che rimangono croniche portatrice di HPV HR sono al momento descritte come il vero gruppo ad alto rischio per ca cervicale



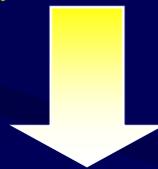
- TIPIZZAZIONE TIPO-SPECIFICA SULLE PERSISTENTI E
- NEL FOLLOW-UP delle lesioni trattate

‘Type specific persistence of High risk human papilloma virus (HPV as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women’

Meijer BMJ 2002

Le donne che erano positive anche al secondo test avevano un più forte rischio di:

- Lsil (34.3 , 17.6-67)
- Hsil (60.7 , 25.5 -144).



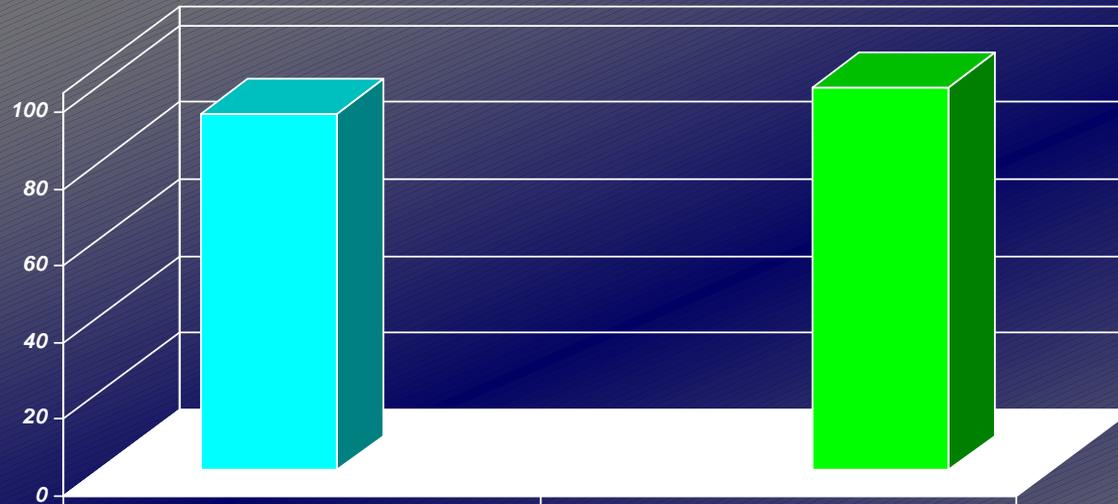
Il rischio di lesioni di alto grado era ancora più alto se la positività era dovuta allo stesso tipo di virus (813,0: 168.2-3229.2)

Clearance TIPO-SPECIFICA

(modificata da Franco :Cancer ep, Biomark & Preven 2003)

Tipo HPV	Mediana 95% CI peristenza (mesi)	Media 95% CI persistenza (mesi)	% positivi a 1 anno (95% CI)
Hpv 6	6.4 (4.9-7.8)	8.7 (6.8-10.6)	42 (19-65)
Hpv 16	19.4 (11.2-27.5)	18.3 (12.9-23.7)	62 (46-78)
Hpv 18	9.4 (4.8-14.0)	11.6 (8.8-14.4)	40 (15-65)
Hpv 31	20.0 (13.4-26.6)	14.6 (11.0-18.1)	62 (35-89)
Hpv 39	8.0 (5.8-10.1)	11.0 (7.0-14.9)	32 (3-61.9)
Hpv 53	13,9 (11.1-16,8)	14.8 (11.4-18.3)	62 (41-83)
Hpv HR	13,2 (10,2-16,2)	16.3 (13,7-18.9)	56 (44-68)

HPV DNA in 1050 carcinomi cervicali invasivi di 22 nazioni diverse



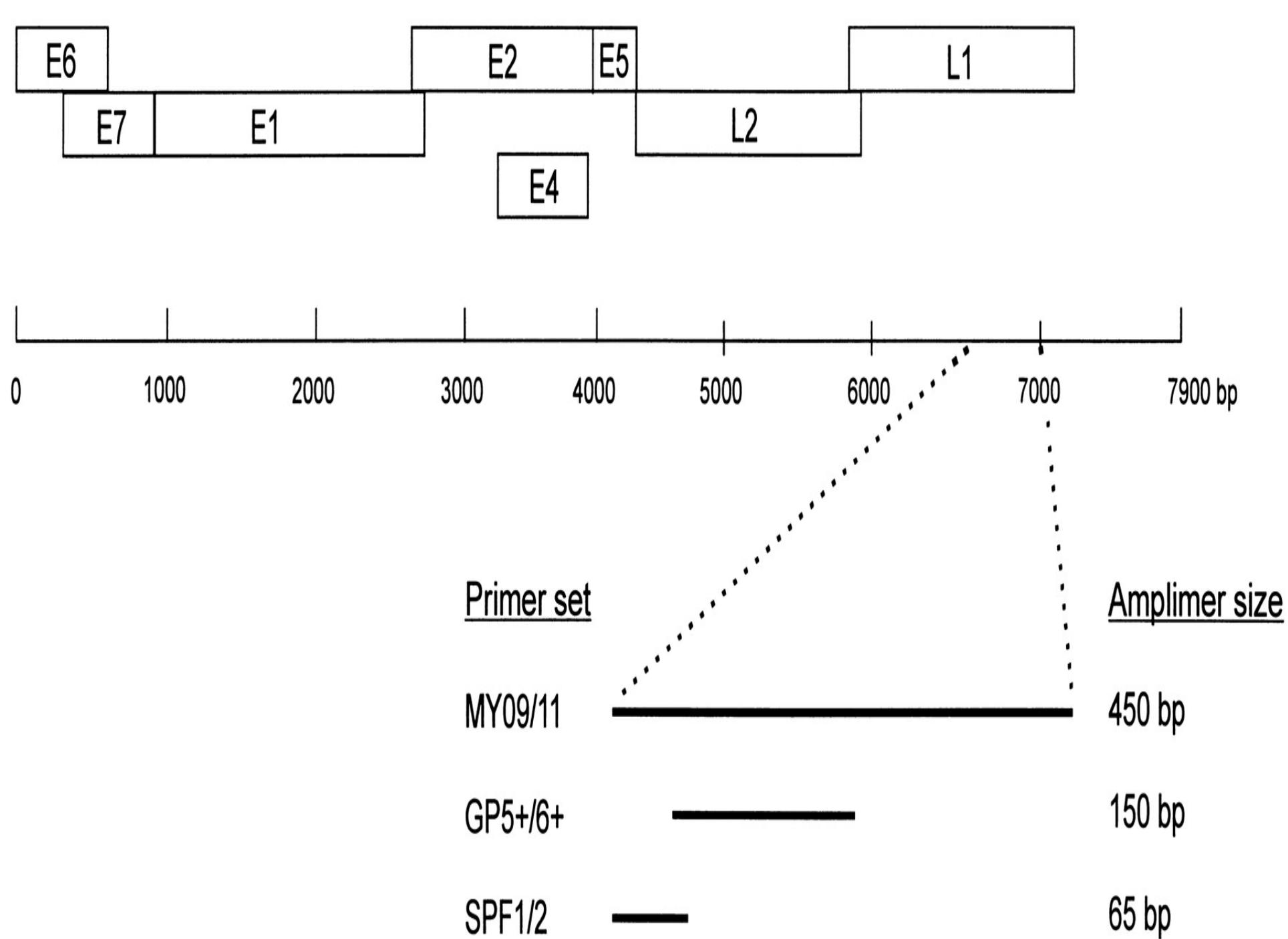
■ Bosch 95

92,9

■ Walboomers 99

99,7

• **SCELTA DEI PRIMERS**

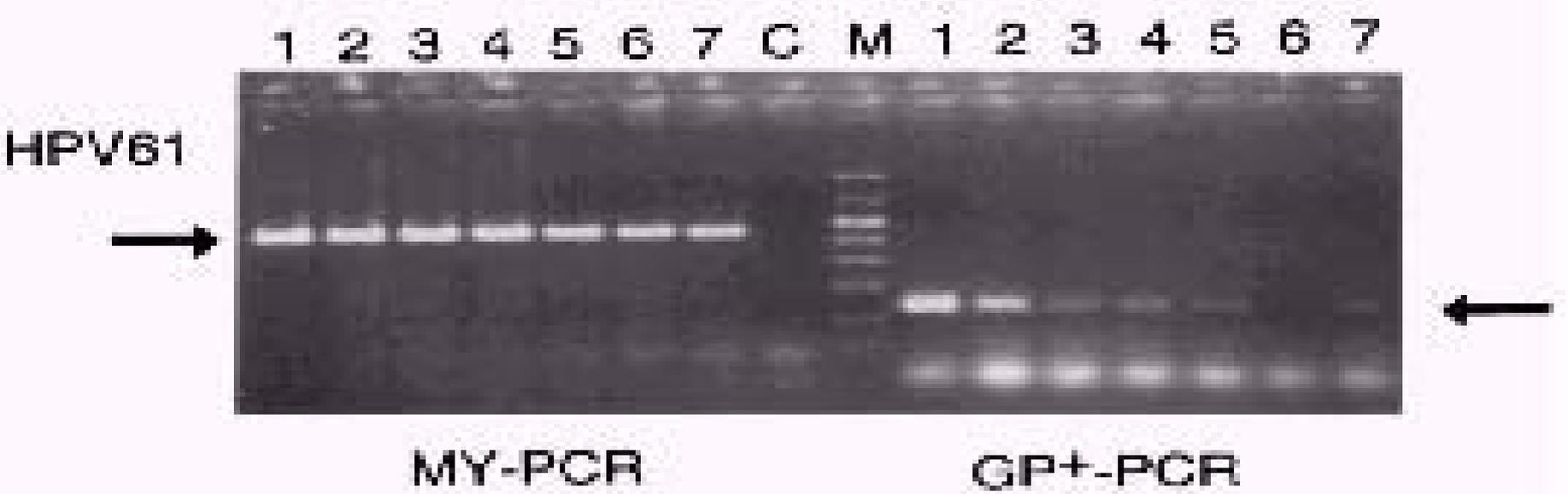
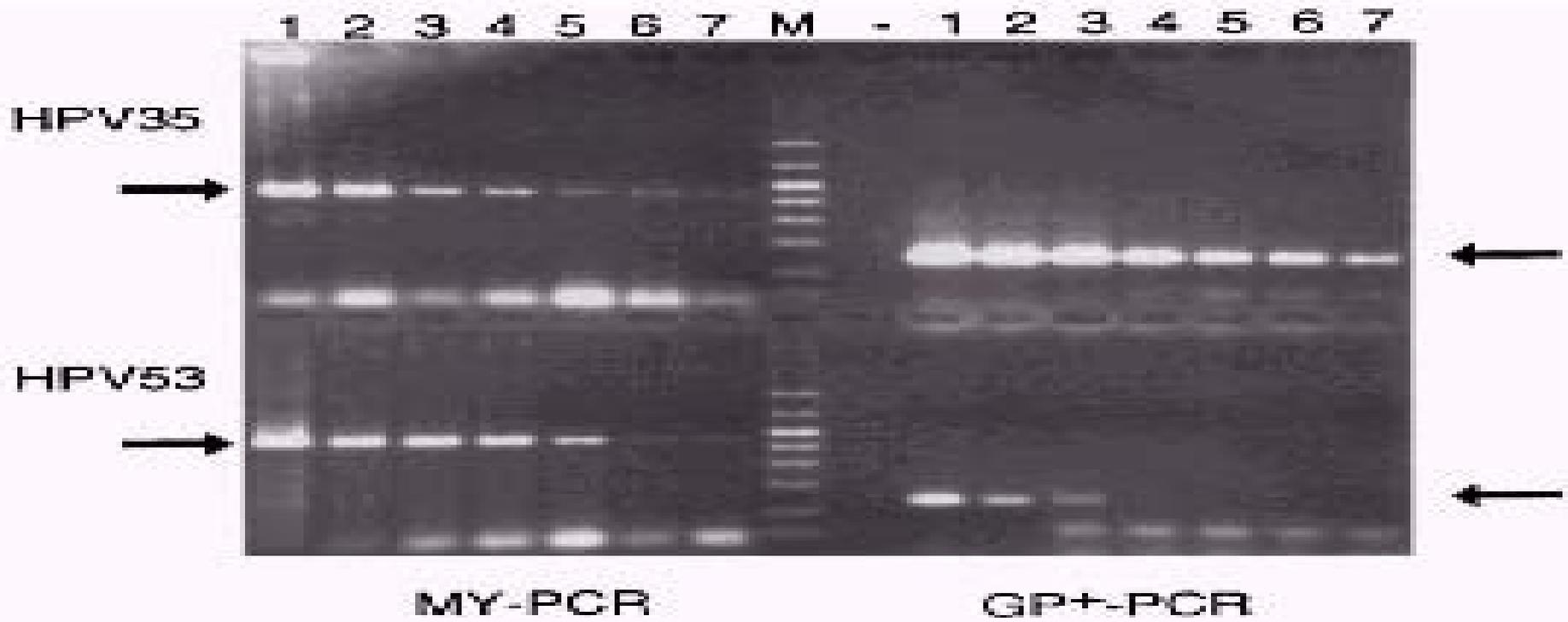


Primers HPV

Nome	Primers	Prodotto	Sensib analitica fg	N. HPV individ
MY09/ MY11	degenerati	450bp	0,1-100	Genotyping ∞
PGMY09/ MY11	Primers consensus mix	450 bp	0,1	LBA 27 MWP 10 Genotyping
Gp5+/ GP6+	Primers consensus	150 bp	0.5-10	MW20 P RLFP ∞ .. Genot∞otyping LBA 37
SPF10	Primers consensus mix	65bp	0,1-10	ReversLiPA 43

CONFRONTO PRIMERS

Metodo 1	Metodo 2	Concord	kappa	Commenti
My09/11	HC2 1 pg	71,1	0,58	Analisi ristretta ai tipi individuati da entrambi i metodi
My09/11	Gp5+/GP6+	94,7	0,79	< efficienza per tipo 35 con My < efficienza per tipi 53 e 61 con Gp5+ Gp5+ individua meno infezioni multiple (47%) rispetto a My (90%)
My09/11LB	PGMY09/11 LB	87.7	0,83	
SPF-Lipa	Gp5+/6+ EIA	69.0	0.77	HPV 34,53,70,74 non represented in Gp5+



SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

- Although Gp5+/GP6+ PCR method apparently underestimates the actual HPV DNA prevalence in women with normal cytology compared with the SPF10 methods, the assay has an excellent NPV for CIN2+ lesions in women with both normal and abnormal cervical scrapes.

TIPIZZAZIONE

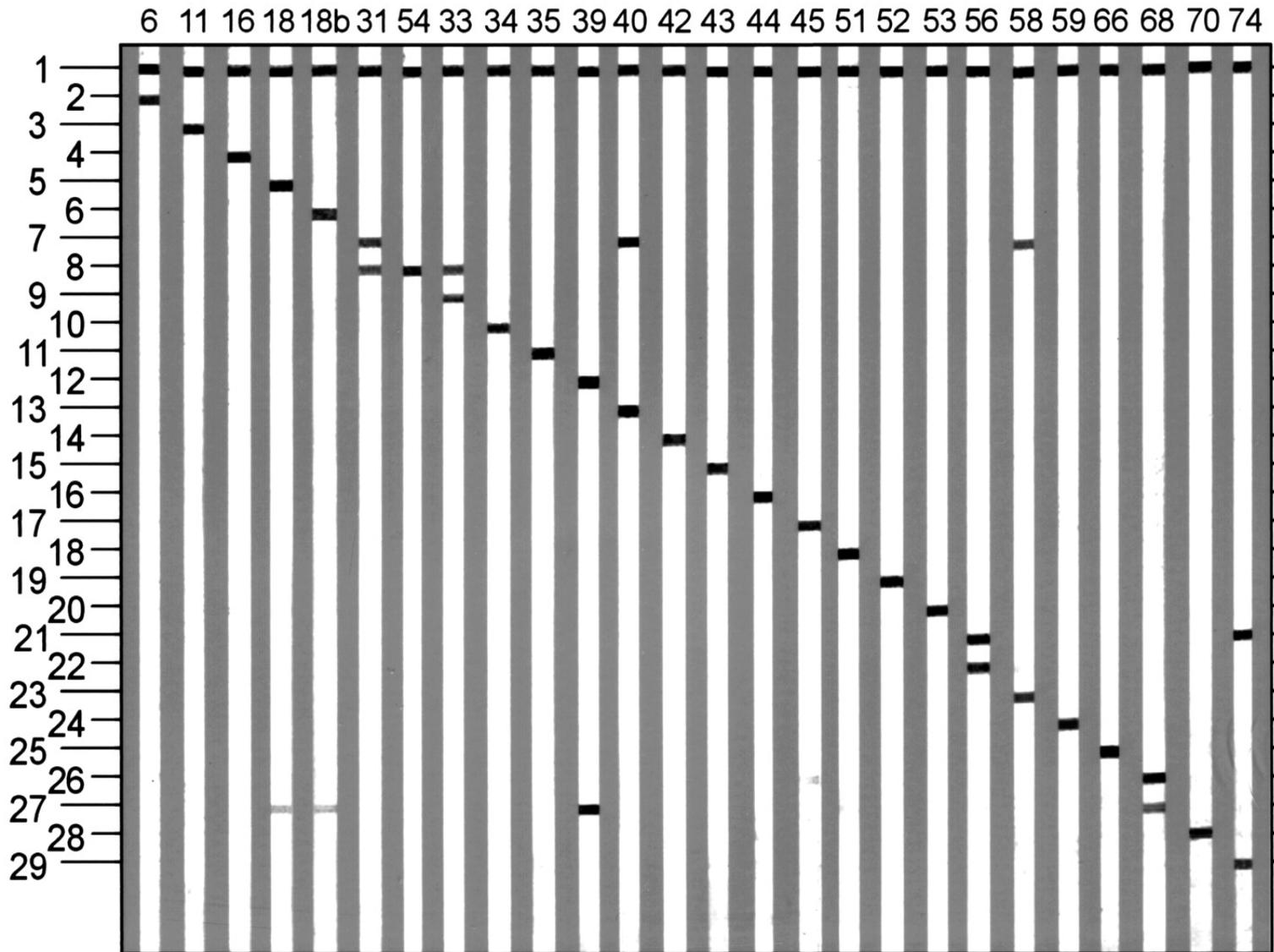
Può essere fatta con diversi metodi:

- con primers tipo-specifici
- con probe tipo-specifici: in micropiastra, in reverse dot blot..,
- con enzimi di restrizione
- Con sequenziamento

Probe

HPV DNA

- 1 = Conjugate control
- 2 = HPV 6
- 3 = HPV 11
- 4 = HPV 16
- 5 = HPV 18
- 6 = HPV 18 (*1)
- 7 = HPV 31 / 40 / 58
- 8 = HPV c31
- 9 = HPV 33
- 10 = HPV 34
- 11 = HPV 35
- 12 = HPV 39
- 13 = HPV 40
- 14 = HPV 42
- 15 = HPV 43
- 16 = HPV 44
- 17 = HPV 45
- 18 = HPV 51
- 19 = HPV 52
- 20 = HPV 53
- 21 = HPV 56 / 74
- 22 = HPV c56
- 23 = HPV 58
- 24 = HPV 59
- 25 = HPV 66
- 26 = HPV 68 / 45
- 27 = HPV c68
- 28 = HPV 70
- 29 = HPV 74



Tipizzazione con Reverse dot blot: 25 tipi

HPV e infezioni multiple

Dati Letteratura: 7,3% casi 1,9% controlli

Cuschieri K. J Clin Path 2004:

3,4 % in campioni negativi (HR 2.5%)

33,1% in campioni borderline (HR 17.5%)

41,8% displasia lieve (HR 25.6%)

40,4% displasia moderata/grave (HR 35.1%)

Confronto Tipizzazione MWP, Line blot, Sequencing (100 casi)

➤ PGMY09/11: 10 tipi tipizzabili (6,11,16,18,31,33,35,45,52,58)

67% tipizzabili (non tipizzabili, tutti per tipi hpv non inclusi)

coinfezioni 18%

Concordanza sequenza 93%

➤ InnoLipa Reverse Dot Blot : 25 tipi HPV

98% Tipizzabili,(non tipiz 61 non incluso e 58)

coinfezioni 38%

(HR 21%)



Tipizzazioni con primers tipo specifici:

80%

concordanza MWP/Line Blot: 90%

Concordanza Sequenza: 89%

PROGRAMMI DI SCREENING

CARATTERISTICHE DEL METODO

- Altamente sensibile e specifico
- Determinazione di un ampio spettro di HPV HR
- **Minime quantità di campione**
(prelevato in maniera non invasiva)
- Alta riproducibilità intra/interlaboratorio
- Possibilità di eseguire molti test
- Semiautomatico o interamente automatico
- Costo limitato

Prelievo per HPV Dna Test

- Prelievo citologico tradizionale



Strisciato su vetrini
(PCR)



mezzo di trasporto
liquido

Prelievo dei campioni

Digene Cervical Sampler™



- Digene Specimen Transport Medium™
 - Appositamente ottimizzato per il DNAPap test, è il modo più rapido per ottenere un risultato HPV
 - Non serve alcuna preparazione dei campioni prima del test hc2
 - Consente di realizzare i test hc2 HPV, CT/GC, CT-ID o GC-ID di Digene con un singolo campione

Prelievo dei campioni II

Test dell'HPV da campioni per citologia in fase liquida

- Per aumentare la flessibilità i campioni si possono anche prelevare con mezzi per citologia in fase liquida, compresi i test ThinPrep® Pap Test™ e SurePath™.
- Dopo aver eseguito l'esame citologico in fase liquida i campioni devono essere trattati prima di poter eseguire il test dell'HPV (test di conversione x hc2).

Conservazione del campione

Cancer 2003

Sistemi di prelievo e conservazione utilizzati per la citologia in fase liquida sono sistemi utilizzabili per:

- ricerca hpv (Preservcyt HC2 10 years)
- Tipizzazione hpv (Preservcyt PCR 4 Years)
- Test immunocitochimici (56 gg)
- Valutazione overespressione m-RNA (30 gg)

‘Stability of liquid pap specimens for the detection of High-risk HPV types with Roche Amplicor HPV test’

21st International Conference HPV, 2004

Kosarikov and Rita Sun

- Cervical specimens collected in Surepath preservative fluid remained stable for testing when stored for up to 2 weeks at 2-8°C.

'Recovery of DNA HPV for PCR analysis from HCII Denaturing Reagent'

- 21st International Conference HPV, 2004
Rabelo –santos and Sophie Derchain

....it is possible to extract DNA for HPV from HCII denatured material stored at -20°C for 18 months for detection by PCR amplification

PROGRAMMI DI SCREENING

CARATTERISTICHE DEL METODO

- Altamente sensibile e specifico
- Determinazione di un ampio spettro di HPV HR
- Minime quantità di campione
(prelevato in maniera non invasiva)
- **Alta riproducibilità intra/interlaboratorio**
- Possibilità di eseguire molti test
- Semiautomatico o interamente automatico

RIPRODUCIBILITA'

Problematiche

- Materiale biologico da trattare
- **Abbondanza del target genico da identificare**
- Preparazione del campione
- **Presenza di inibitori della reazione**
- **Perdita di ottimizzazione di una o più fasi della reazione**

possono interferire sulla sensibilità
e sulla specificita' della reazione.

Intralaboratory and Interlaboratory quality control of HPV DNA testing in Clinical samples in seven laboratories participating at the same Trial

Carozzi Francesca ^{*(1)}, Sani Cristina ⁽¹⁾, Del Mistro Annarosa ⁽²⁾, De Marco Laura ⁽³⁾, Gillio-Tos Anna ⁽³⁾, Ronco Guglielmo ⁽³⁾, Girlando Salvatore ⁽⁴⁾, Obrelli C, Pellegrini Antonella ⁽⁵⁾, Pierotti Paola ⁽⁶⁾, Schiboni Maria Luisa ⁽⁵⁾, Carroccia Rosanna ⁽²⁾, Trevisan R, Vignato Alberta ⁽⁷⁾, Confortini Massimo ⁽¹⁾.

(1) CSPO Firenze, (2) University of Padova, (3) CPO Torino, (4) 'S. Chiara' Hospital Trento, (5) 'S. Giovanni' Hospital Roma, (6) 'Maggiore' Hospital, Bologna, (7) Soave Hospital, Verona.

Objective.

- To evaluate the inter- and intra-laboratory reproducibility and the accuracy of the HCII assay within a multicenter randomized controlled trial in Italy, involving seven different laboratories.

- 1. **DNA targets** (samples with a defined concentration of purified HPV DNA in a range from 0 to 150 pg/ml) were included in each test run. Each target had an expected value (rlu/cutoff) on the basis of HPV concentration.
- 2. Three **blinded samples** in Preservcyt® Solution were sent monthly from one laboratory to the others (total 33 samples). Specific Kappa values vs. the average RLU-Ratio, stratified in 3 groups (0-0.99; 1.00-9.99 and 10.00+) were computed
- 3. A subset of 82 samples with **borderline** results (ratio 0.90 to 4.00) was **re-tested**.

Intra-laboratory quality control

Table 1. 'DNA PANEL TARGET'

Name	Characteristic	Conc	EXPECTED results	Obtained results
			HR probe	HR probe
TARGET 1	HPV DNA NEGATIVE	0 pg/ml	< 1	0.25
Target2	HPV 6	5pg/ml	< 1	0.26
Target3	HPV16	5 pg/ml	>=2	4.04
Target4	HPV 18 +	20 pg/ml	>=8	14.53
Target5	HPV 43 +(LR+)	50 pg/ml	< 1	0.36
Target6	HPV 56 +	150 pg/ml	>=80	121.23

Table 3 - Target1 HPV DNA Negative
Expected result < 1 RLU/CO

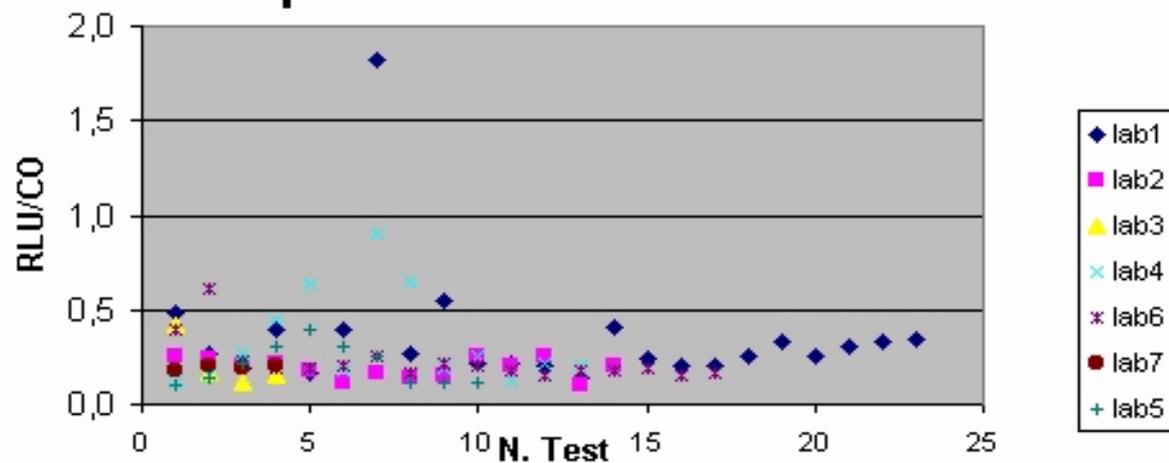
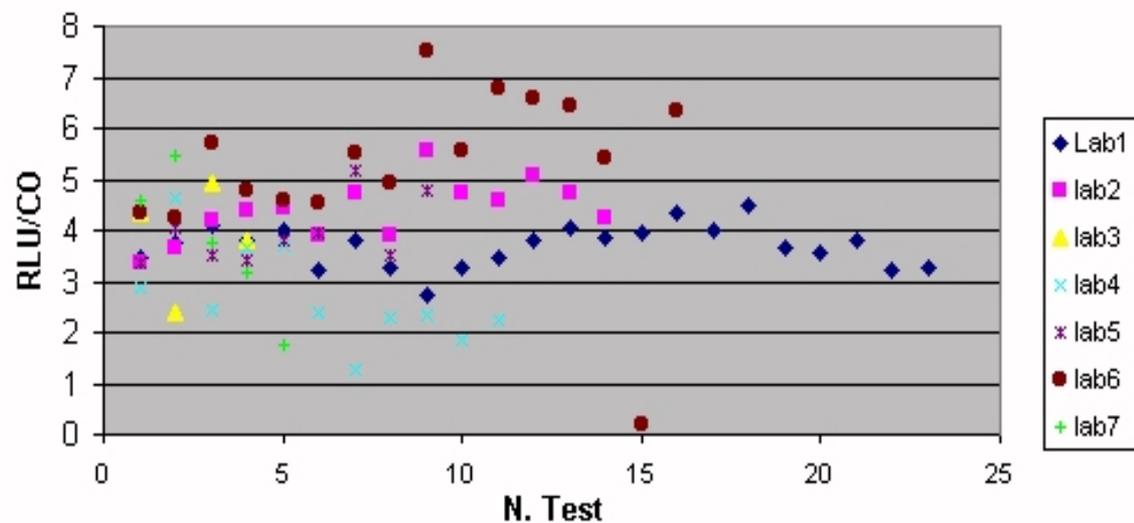


Table 2- Target 3: HPV 16 (5pg/ml)
Expected result: >=2 RLU/CO



we analyzed 432 targets

Hybrid capture: Interlaboratory CDQ



Interlaboratory quality control

Kappa value were calculated based on a cut-off of 1,0pg/ml.

	Kappa
Lab 1	0,85
Lab 2	0,94
Lab 3	1,0
Lab 4	0,93
Lab 5	0,93
Lab 6	0,93
Lab 7	0,86

Check reproducibility low- positive samples (near to cut-off)

- In the meantime, in order to check the reproducibility of the method in borderline samples, a total of 82 samples between 1 and 4 were re-tested
- Repeat testing was performed as:
 - repeat testing on fist conversion residual (already used for first testing)
 - repeat testing on a new conversion

Riproducibilità

dati Digene

- - campioni negativi : riproducibilità 100%
- - campioni con ratio 1-1,2: riproducibilità 50%
- - I campioni con ratio superiore a 1,20 sono riproducibili al 95%

reproducibility borderline positive samples

- Testing on a first conversion residuals and on a new conversion show identical results.
- Overall, 24 of 78 cases (31%) have been confirmed to have borderline values: the remaining 54 resulted negative at retesting.

Reproducibility borderline positive samples

- Limited reproducibility was found in borderline samples. The observed low reproducibility could be due to intrinsic method failure around the cut-off or to low DNA sample content.
- However these results must be taken into account when setting cut-off levels for primary screening use

'Results of HPV DNA testing with the HC2 assay are reproducible' Castle PE, J Clin Micr 2002

- Ripetizione di 1733 test

Test 1 : 1997

Test 2: 2001

Cut-off 1 pg/ml

'Results of HPV DNA testing with the HC2 assay are reproducible' Castle PE, J Clin Micr 2002

	Mediana	Media	Dev st	Range
Test 1	0.3 pg/ml	23.7 pg/ml	134,3	0.1-2233
Test 2	0.4 pg/ml	18.2 pg/ml	105,3	0.01-1956



Differenze statisticamente non significative

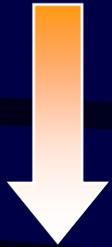
Results of HC2 testing in specimens tested in test 1(1997) and in test 2 (2001) using a 1.0 pg/ml cut-off between negative and positive results

		Test 2		
		Neg	Pos	Total
Test 1	Neg	1360	71	1431
	Pos	71	232	303
Total		1431	303	1734

‘Results of HPV DNA testing with the HC2 assay
are reproducible’

Castle PE, J Clin Micr 2002

- 142 casi discordanti → 8%



124 la variazione era da neg/bassi positivi
(63 dal test1, 61 dal test2)

Results of HC2 testing in specimens tested in test 1(1997) and in test 2 (2001) using a 1.0 pg/ml cut-off between negative and positive and a 10.0 pg/ml cut-off between low positive and high positive

		Test 2			
		Neg	Low Pos	High pos	Total
Test 1	Neg	1360	63 	8	1431
	Low Pos	61 	66 	13	140
	High pos	10	16	137	163
	Total	1431	145	158	1734

Low-positive=1-9,995 pg/ml

High positive=>10 pg/ml



‘Results of HPV DNA testing with the HC2 assay
are reproducible’

Castle PE, J Clin Micr 2002

124 test borderline HC2 → 92 PCR

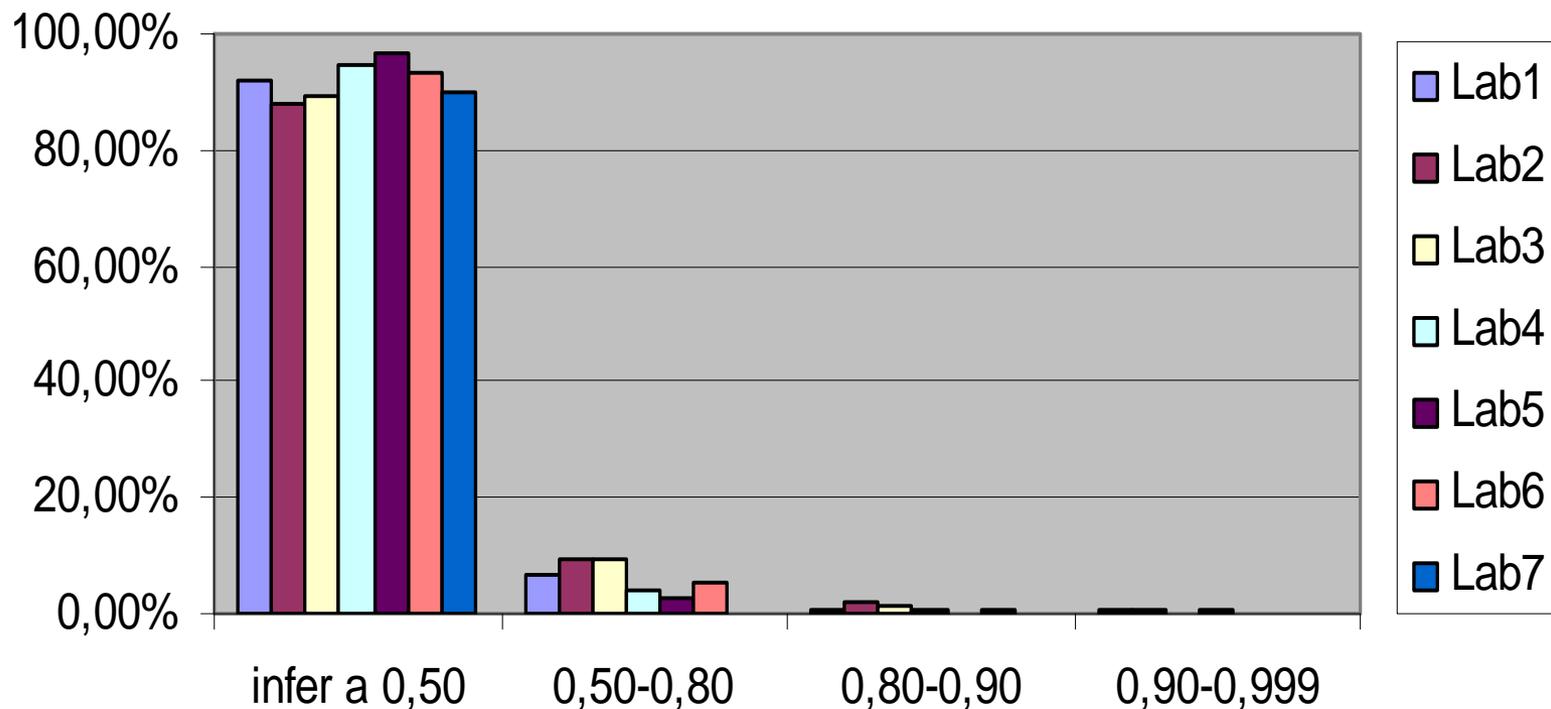


68% pcr negativa

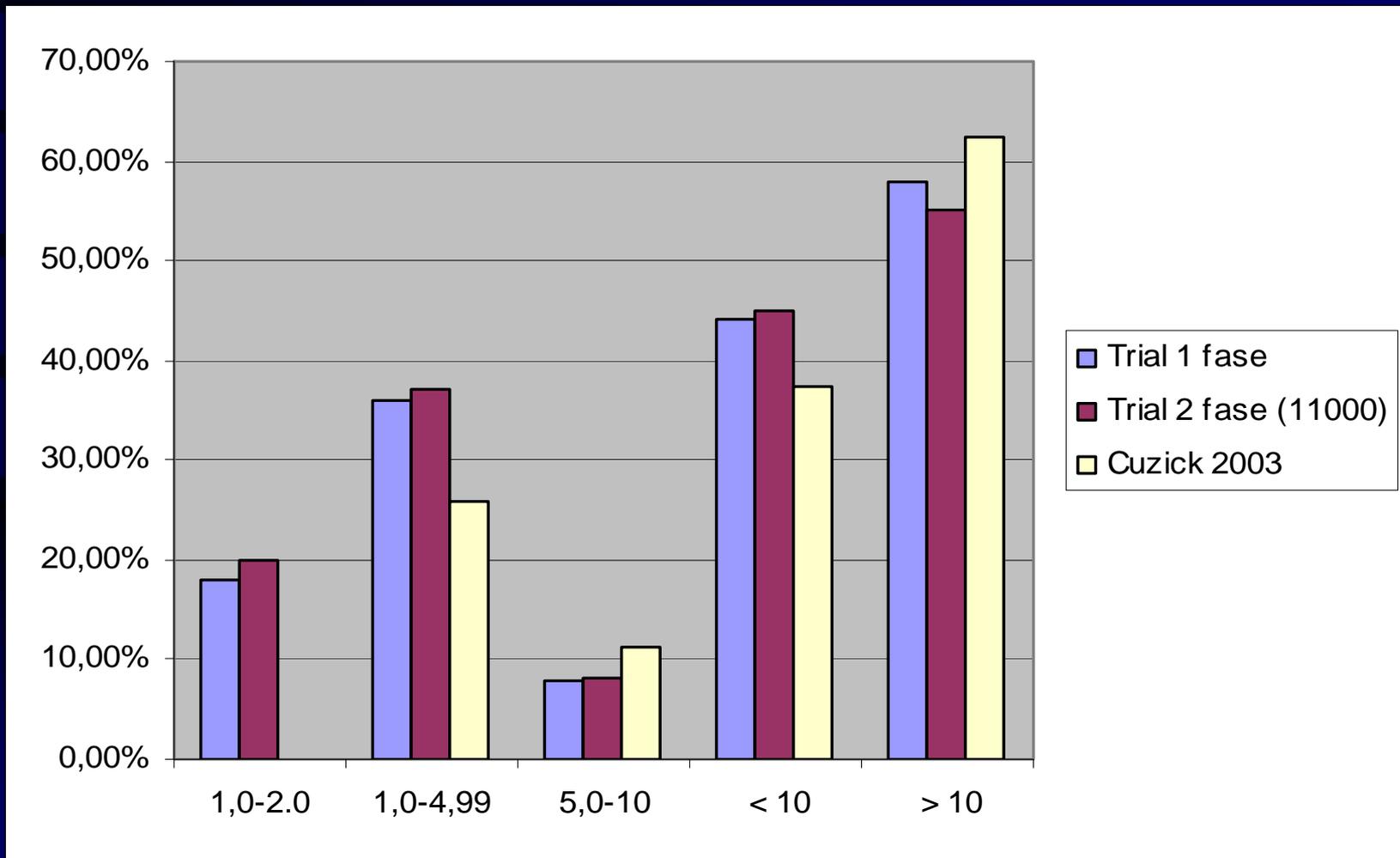
STUDIO ITALIANO MULTICENTRICO :

'NUOVE TECNOLOGIE NELLA PREVENZIONE DEL CARCINOMA CERVICALE

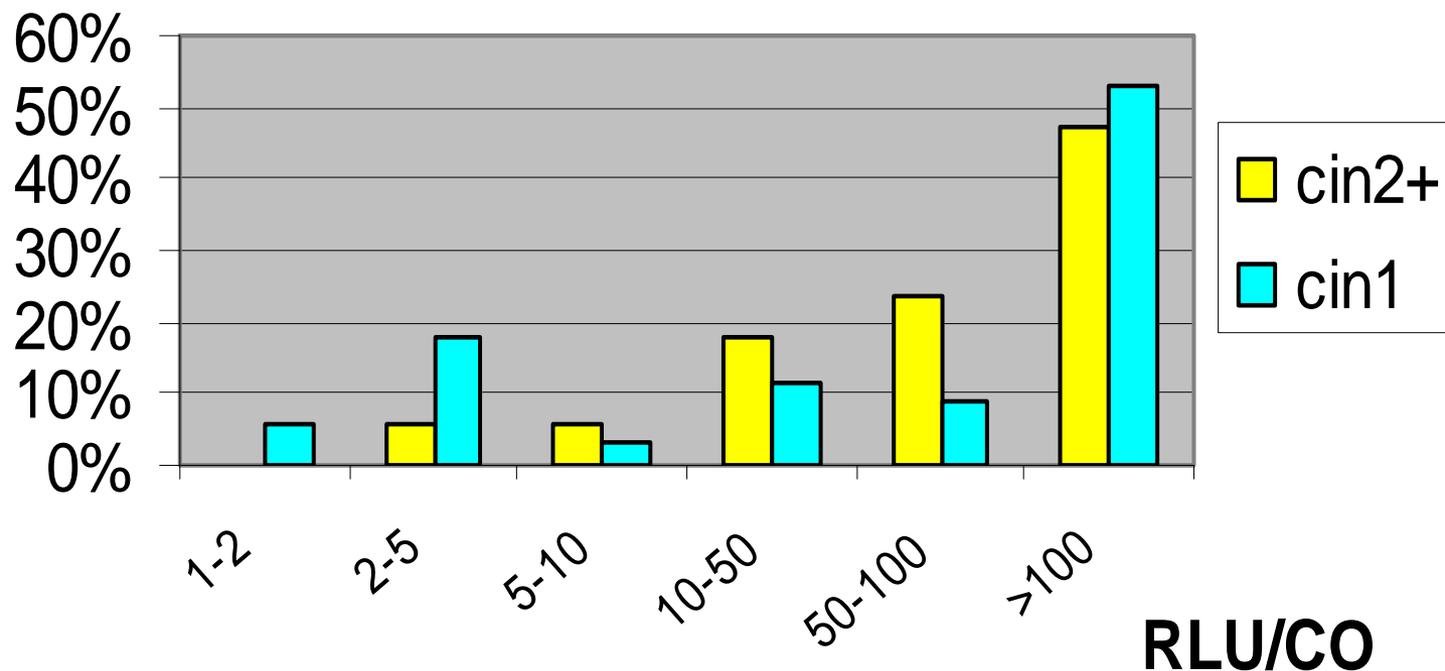
Trial HPV Fase Distribuzione per centro RLU/CO HPV negativi



STUDIO ITALIANO MULTICENTRICO : 'NUOVE TECNOLOGIE NELLA PREVENZIONE DEL CARCINOMA CERVICALE'



'Carica Virale' stratificata per risultato istologico finale - CSPO Firenze 2002



Test virali- controlli di qualità

‘...la standardizzazione dei metodi e l’applicazione di controlli di qualità è un prerequisito indispensabile se il test HPV deve essere integrato alla pratica clinica..’



Tali controlli sono necessari se vogliamo arrivare ad una interpretazione certa dei risultati e per evitare risultati falsi positivi e falsi negativi

Test virali- controlli di qualità

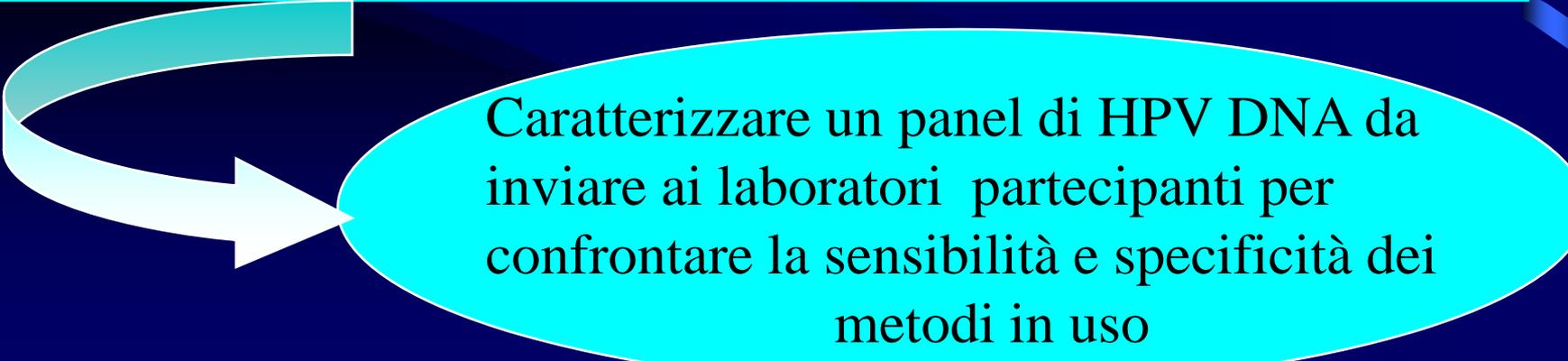
- Sensibilità
- Specificità
- Riproducibilità
- Detection rate
- Accuratezza
- Valutare la performance dei laboratori

PCR : Cdq Esterno (1)

Programmi di controllo di qualità esterni sono limitati a pochissimi casi e applicati ai test più diffusi

Controllo di qualità PCR HPV

- Differenti procedure di estrazione
- Differenze nel set di primer utilizzato
- Differenze metodo di campionamento
- Differenze nel mezzo di trasporto utilizzato
- Taq utilizzata



Caratterizzare un panel di HPV DNA da inviare ai laboratori partecipanti per confrontare la sensibilità e specificità dei metodi in uso

HPV Test: CDQ ESTERNO

- invio campioni da testare
 - ✓ plasmidi con HPV-DNA di differenti genotipi
 - ✓ Campioni clinici
 - ✓ Cellule lisate (PCR e HC2)
- Il panel verrà inviato due volte l'anno e saranno inclusi campioni negativi e positivi. I campioni positivi conterranno differenti tipi di HPV e in concentrazioni diverse .
- Processamento dei campioni secondo le procedure in atto nel laboratorio (HC o PCR + tipizzazione tipo specifica)

HPV Test: CDQ ESTERNO

- i campioni dovranno essere effettuati in duplicato in due giorni separati
- questionario circa le procedure utilizzate da ciascun laboratorio partecipante (tipo di estrazione, procedura ...) sarà distribuito e i dati saranno raccolti in un database per la successiva elaborazione .



CENTRO
PER LO STUDIO
E LA RICERCA
AMBIENTALE

f.c