



Lezione base il test HPV nello screening con HPV primario

Presentazione Allestita da : Francesca Carozzi*, Annarosa Del Mistro^o,
Simonetta Bisanzi*, Elena Burroni*, Cristina Sani*

*ISPRO-Firenze

^o Istituto Oncologico Veneto, Padova

Executive summary del report HTA italiano

ELEMENTI ESSENZIALI DI UN PROTOCOLLO APPROPRIATO

- **Lo screening basato sul test HPV non deve iniziare prima dei 30-35 anni.**
- **L'intervallo di screening** nell'ambito di programmi organizzati di popolazione dopo un test HPV primario negativo **deve essere di almeno 5 anni.**
- **Le donne positive ad HPV non devono essere inviate direttamente a colposcopia**, ma è necessario utilizzare sistemi di **trriage**. Il metodo attualmente raccomandabile è basato sull'esecuzione della citologia (Pap test) nelle donne HPV positive.
- **I test per il DNA di HPV oncogeni utilizzati devono essere validati** quanto a sensibilità e specificità per lesioni di alto grado, secondo ciò che è riportato nelle Linee guida europee.
- **Non esistono prove che il doppio test con citologia e HPV sia più protettivo del solo test HPV come test primario,**



Documento Ministero Executive summary Report HTA italiano

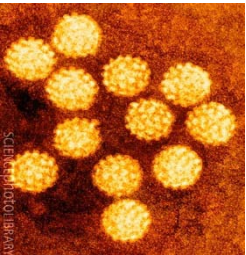


EFFICACIA e Appropriatelyzza

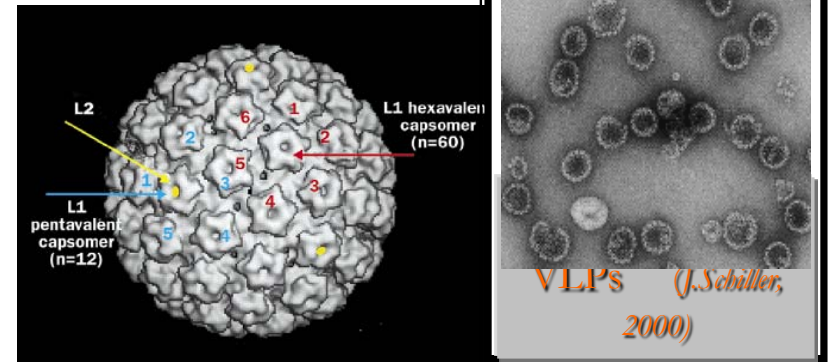
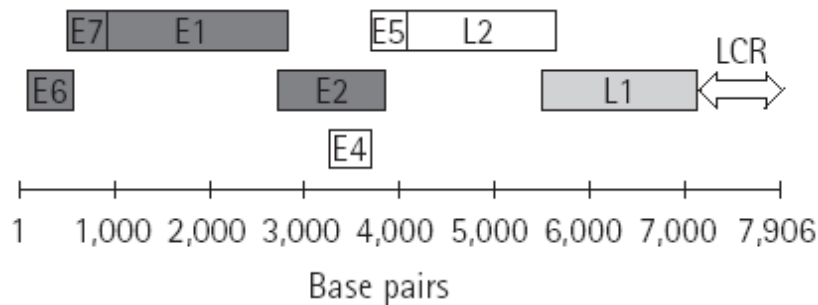
Un programma con HPV primario è più efficace dello screening basato sulla citologia nel prevenire i tumori invasivi del collo dell'utero:

- Forte evidenza scientifica
- Test clinicamente validati per il DNA di HPV oncogeni
- Utilizzo del test HPV nelle donne >30 anni
- Applicazione del protocollo di gestione delle donne con test HPV positivo appropriato per:
 - Evitare un inutile invio ad approfondimenti diagnostici
 - Limitare la sovradiagnosi
 - Evitare sovratrattamento di lesioni spontaneamente regressive.

HPV - Papilloma Virus Umano



I Papillomavirus umani hanno una struttura icosaedrica e sono caratterizzati da un DNA circolare a doppia elica, contenente 7800-7900 paia di basi che codifica per otto diverse proteine. Ne esistono oltre 200 tipi.



Le due proteine strutturali, L1 e L2, formano l'involucro esterno, o capside virale, mentre le proteine non strutturali sono importanti per il ciclo vitale del virus. **L1 & L2 contengono epitopi neutralizzanti.**

Le proteine E6 ed E7 rappresentano le proteine ad attività trasformante e hanno un ruolo importante nell'iniziazione del processo oncogenico interferendo con la normale funzione di alcuni geni onco-soppressori.

L'infezione genitale da HPV

- ✓ E' la più comune delle infezioni a trasmissione sessuale, e la trasmissione può avvenire anche tramite semplice contatto nell'area genitale
- ✓ Il 50-80% dei soggetti sessualmente attivi si infetta nel corso della vita con un virus HPV e oltre il 50% si infetta con un tipo oncogeno
- ✓ La storia naturale dell'infezione è fortemente condizionata dall'equilibrio che si instaura fra ospite ed agente infettante (risposta immunitaria)

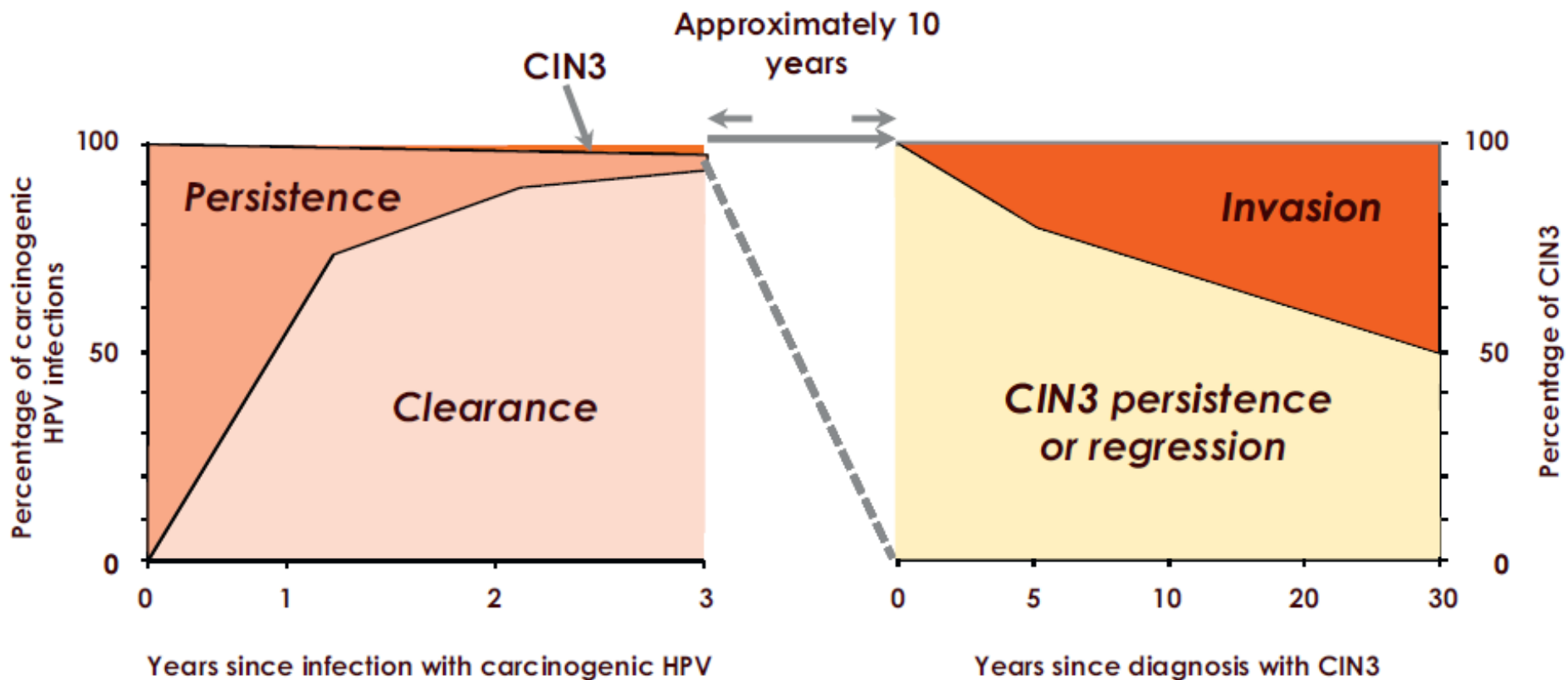
Baseman JG et al. J Clin Virol 2005; 32 Suppl 1; S16-24;

Brown DR et al. J Infect Dis 2005; 191: 182-92;

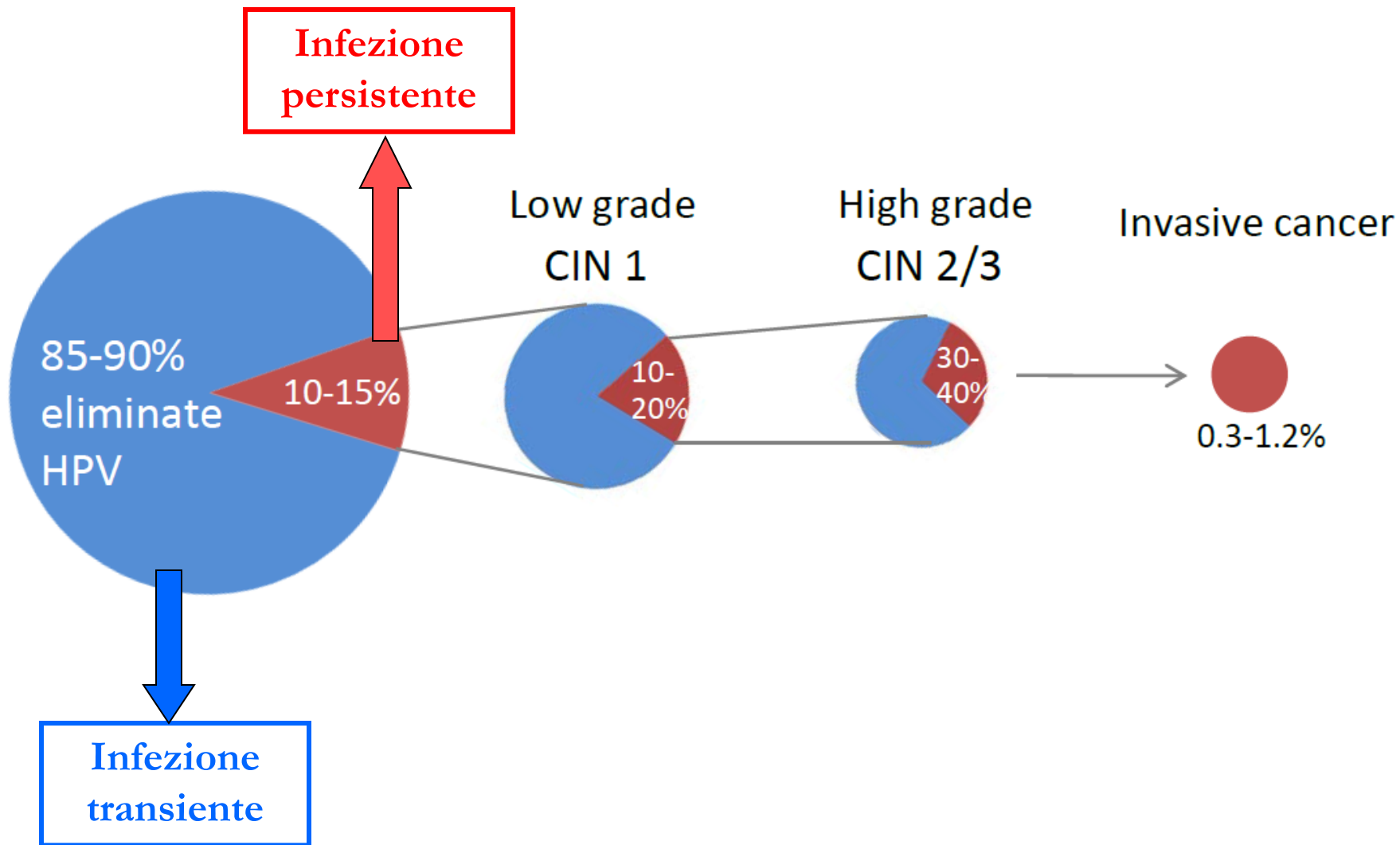
Bosch FX et al. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 3-13;

- ✓ Il carcinoma della cervice è un esito raro di un'infezione frequente
- ✓ Il lungo tempo di latenza tra infezione da HPV ed insorgenza di Ca cervice consente la prevenzione secondaria attraverso lo screening











Quanto tempo intercorre fra infezione e lesione?



Vaccine 2012;30S:F24-F33



A review of human carcinogens—Part B: biological agents

[Véronique Bouvard](#) , [Robert Baan](#) , [Kurt Straif](#) , [Yann Grosse](#) , [Béatrice Secretan](#) , [Fatiha El Ghissassi](#) , [Lamia Benbrahim-Tallaa](#) , [Neela Guha](#) , [Crystal Freeman](#) , [Laurent Galichet](#) , [Vincent Cogliano](#) , on behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group

Special Report: Policy

A review of human carcinogens—Part B: biological agents

Un gruppo di 12 tipi di HPV causa virtualmente tutti i casi di carcinoma cervicale
HPV 16,18,31,33,35,39,45,51,56,58,59

the biological agents classified as in Africa. New evidence points to in Kaposi's sarcoma and in primary "carcinogenic to humans" (Group 1) a role for EBV in 5–10% of gastric effusion lymphoma—in individuals who and to identify additional tumour sites carcinic unocompromised and in those



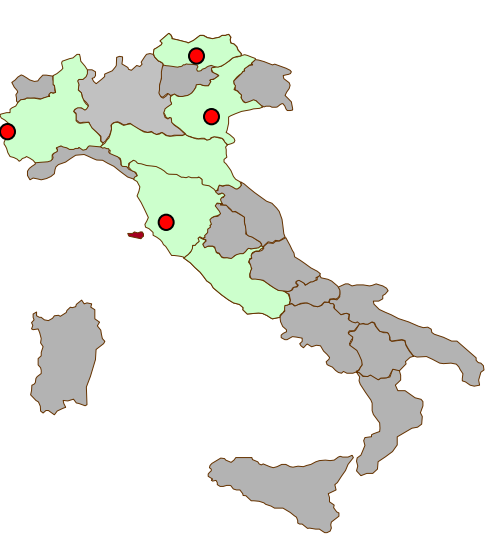
Group	HPV types	Comments
Alpha HPV types		
1	16	Most potent HPV type, known to cause cancer at several sites
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Sufficient evidence for cervical cancer
2A	68	Limited evidence in humans and strong mechanistic evidence for cervical cancer
2B	26, 53, 66, 67, 70,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

il termine ‘test HPV’ nel protocollo di screening indica un test che ricerca solo gli di HPV oncogeni 12 genotipi (IARC Lancet 2009) validati in base alla sensibilità e specificità clinica trasversali, secondo le indicazioni internazionali (Meijer et al *Int J Cancer* 2009;124:516-20)

Prevalenza HPV in Italia:

25-60: popolazione di screening NTCC+ Sud Italia

18-24 : popolazione generale, donne invitate tramite lettera



Studio NTCC 50.000 donne 25-60 anni
(PI. Ronco Turin)



Studio ASP : Prevalenza in 4000 donne 25-60
in regioni non incluse nello Studio NTCC (PI
Giorgi Rossi Roma)



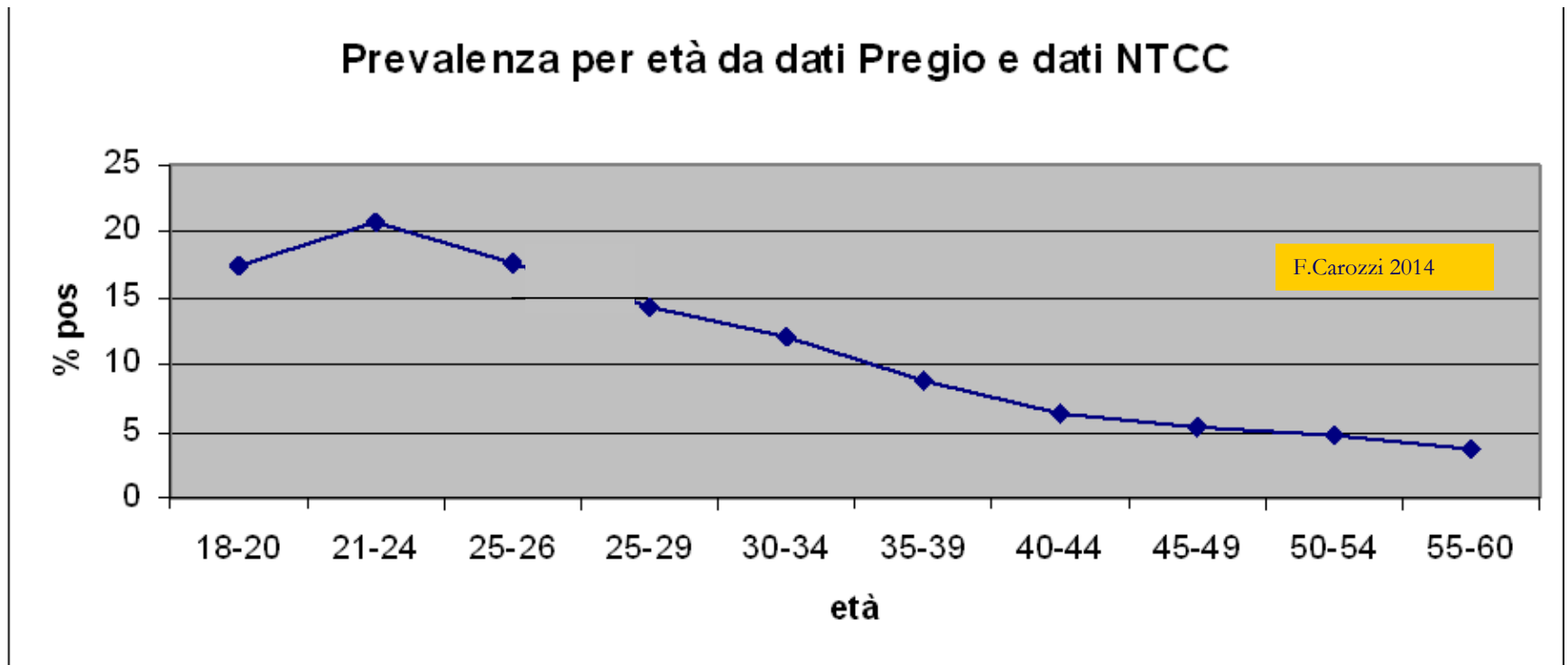
Studio Pregio 4000 giovani
donne 18-26 invitate tramite
lettera (PI Salmaso ISS
Rome)

Il Ministero della Salute ha supportato :

- 3 diversi studi che hanno coinvolto donne appartenenti alla popolazione generale
- 1 studio su campioni paraffinati di casi confermati istologicamente (\geq CIN2)

Descrivere la prevalenza dell'infezione da HPV nella popolazione generale e stratificata per età e la distribuzione per tipo di HPV, prima dell'introduzione della vaccinazione HPV

Prevalenza **HPV-HR** per età da :
studio Pregio (18-26) e NTCC (25-60)



Studio NTCC- Fase 1 e Fase 2

Proporzione di donne HPV-HR positive per gruppo di età

Ronco JNCI 2006;98:765-74

Ronco Lancet Oncol 2006;7:547-55

Donne arruolate:

Fase 1: 45.174

Fase 2: 49.001

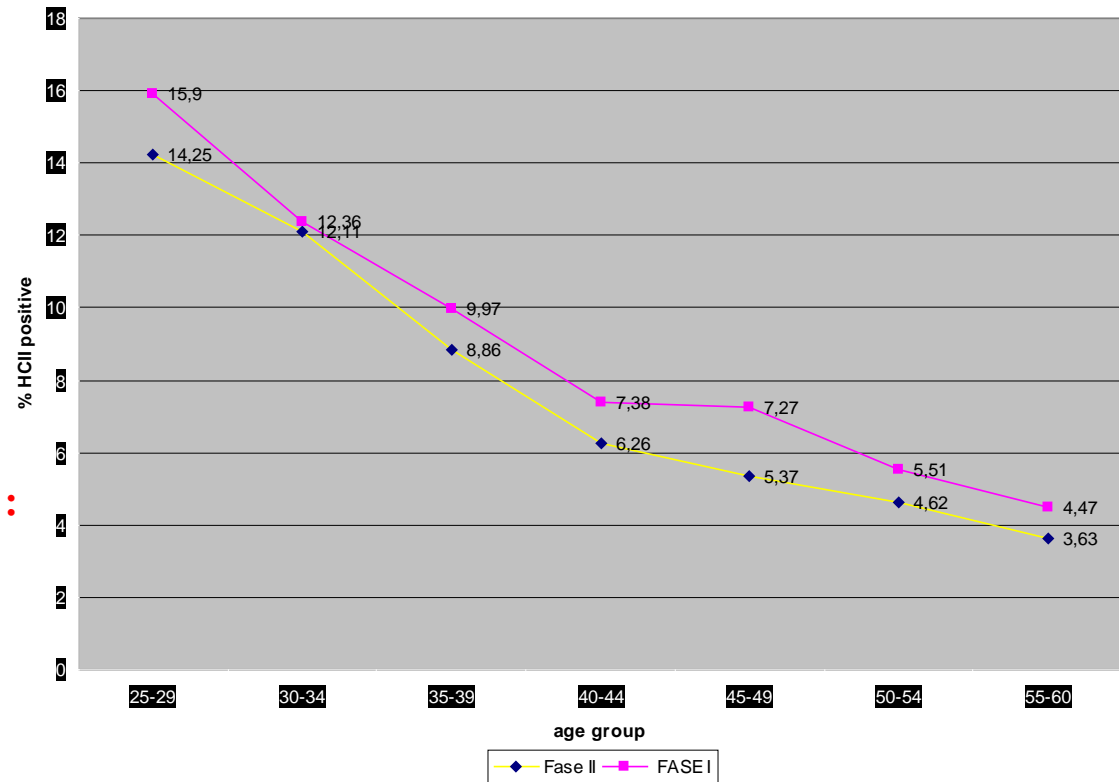
Totale: 94.175

Donne arruolate per braccio :

Sperimentale: 47.307

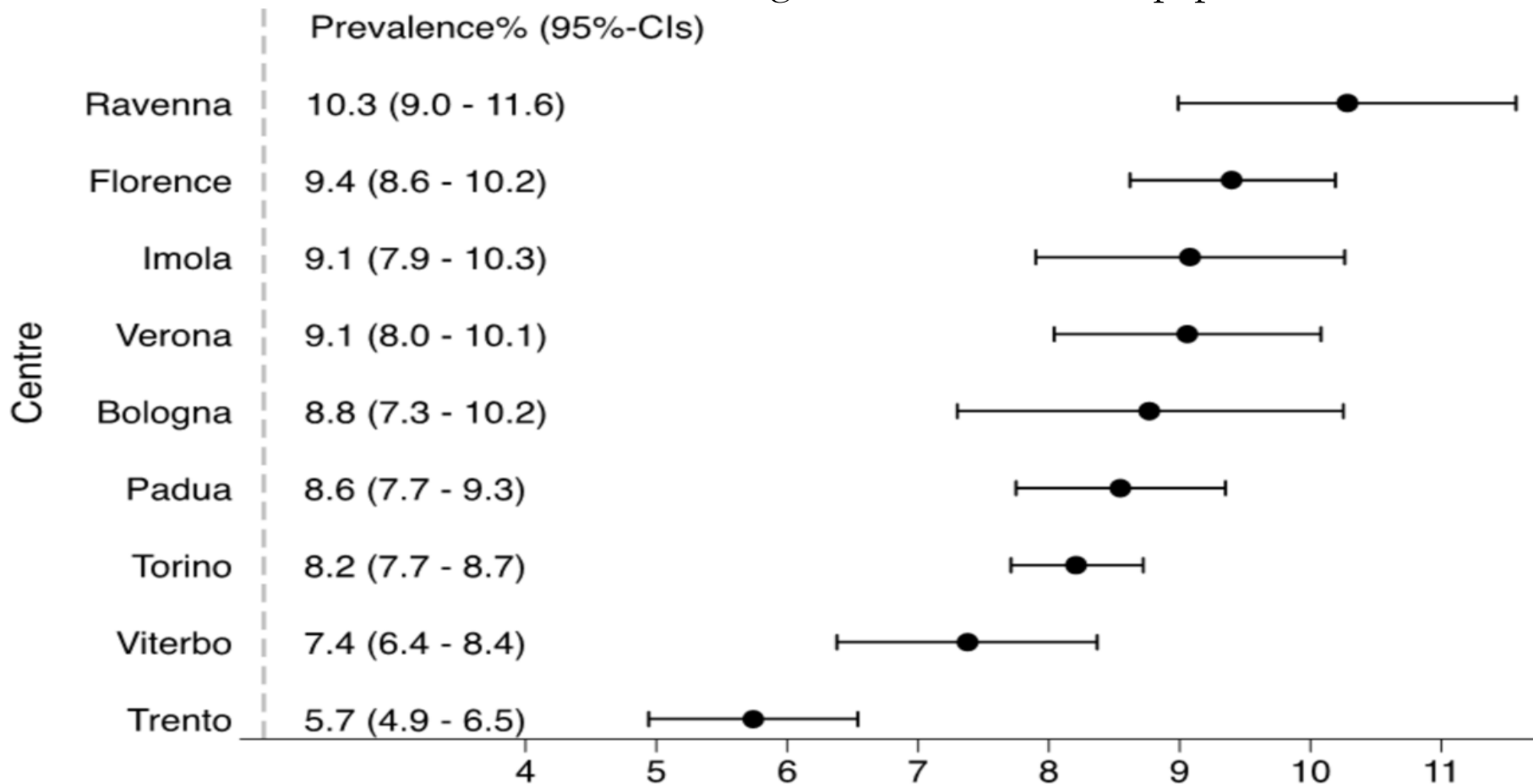
Convenzionale: 46.868

Prevalenza 25-60, 7.9%



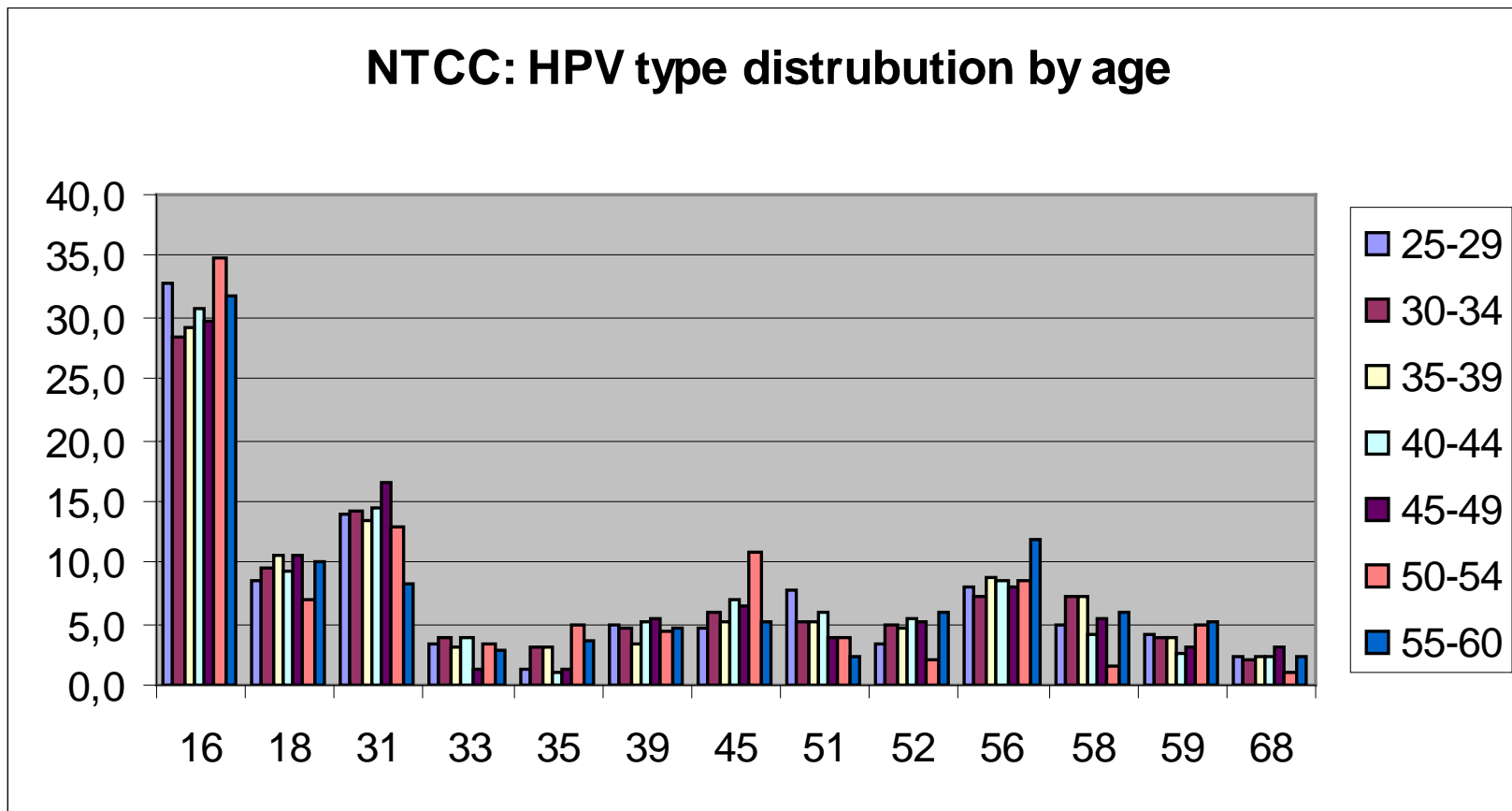
**Figura 2. Prevalenza standardizzata per età, per centro di arruolamento.
(Da Baussano et al 2013)**

CI: intervallo di confidenza; HR: high-risk; HPV: human papillomavirus.



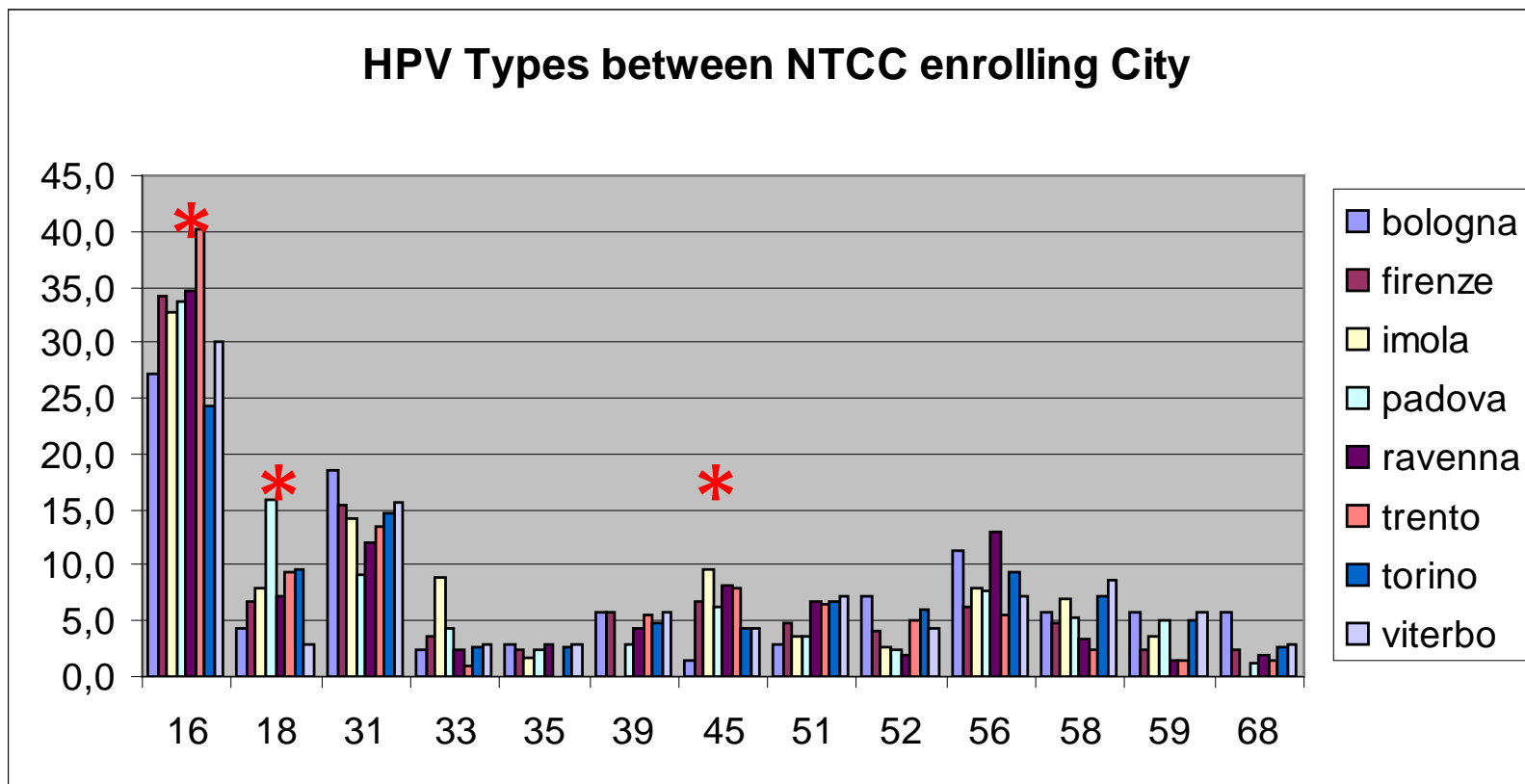
La proporzione di donne hr- HPV positive differisce tra i vari centri (da 5.7 a 10.3%)

Studio NTCC : distribuzione dei tipi HR-HPV per età all'arruolamento (Carozzi et Al , 2013)



Non c'è differenza per età

Distribuzione dei tipi HR-HPV per centro di arruolamento, dati provenienti dallo Studio NTCC (Carozzi et al 2013)

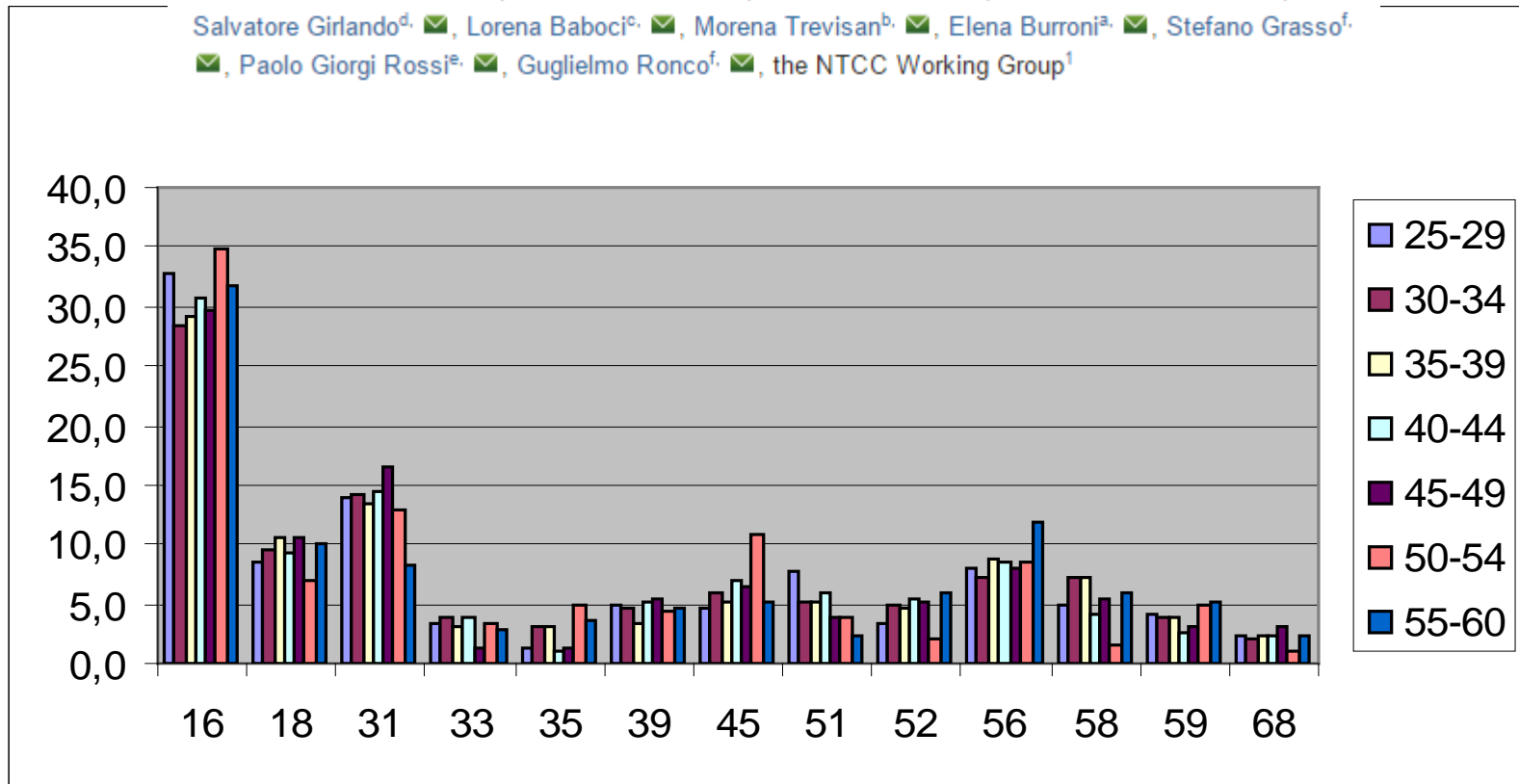


P < 0.0001

La distribuzione dei tipi HPV per centro è significativamente eterogenea, ma non lo è tra i laboratori che hanno eseguito le tipizzazioni

Age and geographic variability of human papillomavirus high-risk genotype distribution in a large unvaccinated population and of vaccination impact on HPV prevalence

Francesca Carozzi^a, Laura De Marco^b, Anna Gillio-Tos^b, Annarosa Del Mistro^c, Salvatore Girlando^d, Lorena Baboci^c, Morena Trevisan^b, Elena Burrioni^a, Stefano Grasso^f, Paolo Giorgi Rossi^a, Guglielmo Ronco^f, the NTCC Working Group¹



Non c'è differenza per età, la distribuzione dei tipi HPV per età mostra che non c'è una eterogeneità significativa ($p=0,1542$)

[J Clin Virol.](#) 2014 Jul;60(3):257-63.

Test per la ricerca di HPV DNA

- mettono in evidenza un'infezione in atto nell'area sede del campionamento
 - identificano tipi diversi, con sensibilità diversa
 - alcuni test identificano il tipo, altri no
 - il risultato negativo non esclude una precedente infezione o una infezione latente
- **Importante cercare infezioni clinicamente rilevanti**
- **In ambito oncologico serve rilevare solo i tipi ad alto rischio**
- **Significato clinico della genotipizzazione ancora oggetto di studio**

Nello screening

il test HPV non è un test virale
ma un test di rischio oncogeno

- Buon bilanciamento fra sensibilità e specificità clinica per minimizzare le procedure di follow-up non necessarie
- Cautela verso i tentativi di raggiungere una sensibilità clinica del 100% aumentando la sensibilità clinica:
 - un piccolo guadagno in sensibilità risulterà in una drammatica riduzione della specificità clinica (aumento dei falsi positivi)

Le nuove linee guida europee per lo screening della cervice uterina 2015



Oncogenic HPV refers to the 13 high-risk HPV types (hrHPV): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68.

These include the 12 HPV types currently classified as carcinogenic to humans and one type (68) classified as probably carcinogenic to humans in the IARC Monograph Series (Bouvard et al. 2009; IARC 2012).

Unless otherwise indicated, the terms HPV primary testing and HPV primary screening used in this supplement refer to HPV testing conducted with systems based on validated hrHPV DNA assays.

Raccomandazioni sul test HR-HPV come test di screening primario

Indice

1. Il programma di screening con test HPV e citologia di triage
2. Obiettivi del documento
3. Gestione dei campioni
 - 3.1 Il prelievo nello screening con HPV primario
 - 3.2 Identificazione dei campioni e tracciabilità
- 4. Il test molecolare HPV DNA nello screening**
5. Centralizzazione delle analisi di primo livello (test HPV e citologia di triage)
 - 5.1 Carichi di lavoro
 - 5.2 L'organizzazione del laboratorio HPV
 - 5.3 Movimentazione dei campioni HPV-positivi per la citologia di triage
 - 5.4 Archiviazione e smaltimento dei campioni dopo l'esecuzione del test HPV
6. Formazione del personale
7. Procedure di controllo di qualità per i test molecolari
 - 7.1 Controllo di qualità interno (CQI)
 - 7.2 Caratteristiche dei programmi di valutazione esterna di qualità (VEQ) per test HPV di screening
8. Indicazioni per la refertazione del test HPV e della lettera di risposta alla donna
9. Indicatori prestazionali
 - 9.1 Indicatori del processo pre-analitico, analitico e post-analitico
 - 9.2 Verifica delle prestazioni del laboratorio mediante i cicli della VEQ e i controlli interni
 - 9.3 Controllo periodico degli indicatori epidemiologici
- 10 BIBLIOGRAFIA



Documento
approvato
al convegno
GISCI 2017

www.gisci.it

**Nello screening è di fondamentale
importanza rilevare le infezioni da HPV
clinicamente rilevanti**

**perché il test HPV non è un test virale ma un
test di rischio oncogeno**

- la rilevazione di infezioni hrHPV nello screening cervicale è utile solo quando associata con la presenza o lo sviluppo di lesioni CIN2+

Sensibilità e specificità analitica → rilevazione di tutte le infezioni da HPV

Sensibilità e specificità clinica → rilevazione delle sole infezioni da HPV associate a lesioni CIN2+/3+ (lesioni clinicamente rilevanti)

Il test HPV nello screening: la sensibilità clinica e specificità clinica del test

- ✓ Sensibilità clinica per Hr-HPV : proporzione di donne con lesioni CIN2+ che sono correttamente identificate da un test HPV positivo
- ✓ Specificità clinica per Hr-HPV : proporzione di donne senza lesioni CIN2+ che sono correttamente identificate da un risultato negativo
- La sensibilità analitica di un test virale è invece il minimo livello di target che un sistema riesce ad individuare, ma la rilevazione di infezioni hrHPV nello screening cervicale è utile solo quando associata con la presenza o lo sviluppo di lesioni CIN2+

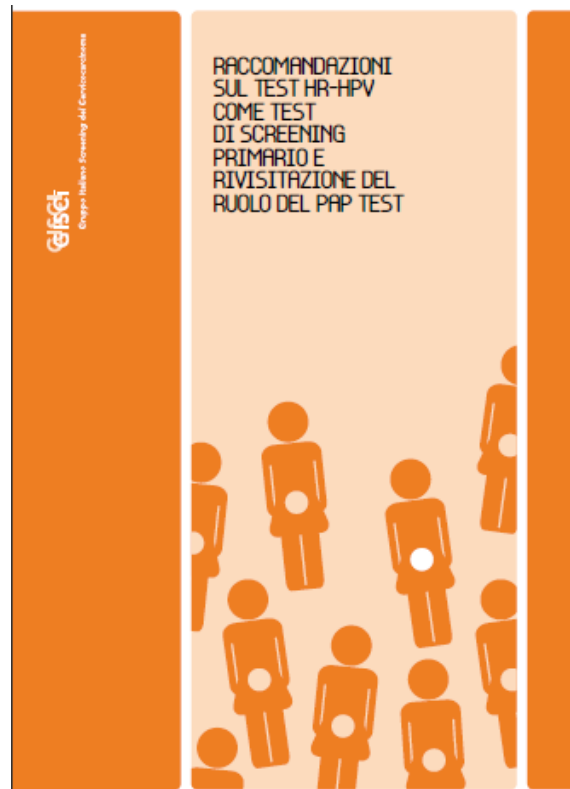
Effetti dell'uso di un test HPV non-clinicamente validato

- **Sensibilità troppo alta:**
 - specificità troppo bassa, troppi falsi positivi
 - molte donne senza lesioni inviate ad approfondimenti
- **Specificità troppo alta, sensibilità non ottimale:**
 - non tutte le lesioni CIN2+ vengono rilevate: casi persi

Quale **test HPV**?

Nello screening primario il test HPV rileva:

- **sequenze DNA (LLGEE 2015 e HTA 2012)**
- **solo tipi ad alto rischio (HR-HPV)**
- **come pool senza identificazione dei singoli tipi**
- **test clinicamente validati (sec. Meijer et al, 2009)**



**il risultato del test hr-HPV è inserito in un percorso con un
preciso algoritmo**

L'algoritmo di screening è totalmente dipendente dalla performance
di test HPV-HR clinicamente validati

IL Test Hr-HPV nello screening cervicale

- ✓ sufficiente nel contesto di protocolli di screening testare il gruppo di HPV ad alto rischio ‘in toto’
- ✓ tipi di HPV ad alto e medio rischio Classificazione IARC 2009
16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 (68,66)
- ✓ **cut-off di positività** adeguato agli scopi dello screening

Documento aggiornato annualmente: ultimo aggiornamento Gennaio 2019

TEST HPV VALIDATI PER LO SCREENING DEL CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA

• Documento di presentazione

- attività e modalità di lavoro

• Rapporto di aggiornamento N. 1, versione 1.1

Revisione 23/05/2016:

- modificati i riferimenti ai sistemi di prelievo
- il presente documento sostituisce il precedente



TEST HPV VALIDATI PER LO SCREENING DEL CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA

• Documento di presentazione

- attività e modalità di lavoro

• Rapporto di aggiornamento N. 4

17 gennaio 2019

Mandato ONS L'ONS ha dato mandato al GISCi di predisporre un aggiornamento periodico dei “Test HPV validati per lo screening” (documento di riferimento: Rapporto HTA HPV del 2012). Il 21 maggio 2015 a Finalborgo (SV), nel corso del Convegno nazionale 2015, l'assemblea GISCi ha recepito con voto unanime il mandato dell'ONS al GISCi per questa attività.

La versione elettronica di questo documento è accessibile dai siti: www.osservatorionazionale screening.it- www.gisci.it

CRONOLOGIA: Rapporto N.1: aprile 2016 Rapporto N.1 versione 1.1: maggio 2016 Rapporto N.2: 29 dicembre 2016 Rapporto N.3: 29 dicembre 2017 Rapporto N.4: 17 gennaio 2019

Caratteristiche principali dei test validati

Test HR-HPV	Geni target	Genotipizzazione	Controllo interno
HC2	RNA full lenght	No	No
GP5+/GP6+	Gene L1	No	No
Abbott Real time High Risk HPV test	Gene L1	14 tipi rilevati (12 HR+66 e 68) – genotipizzazione parziale 16, 18 e otherHPV	β -globina umana
Cobas 4800 HPV test	Gene L1	14 tipi rilevati (12 HR+66 e 68) – genotipizzazione parziale 16, 18 e otherHPV	β -globina umana
Papillocheck HPV screening test	Gene E1	Tipizzazione separata di 12HR-HPV + 66 e 68	ADAT1 (adenosina deaminasi tRNA specifica)
Cervista HPV HR test	L1/E6/E7	14 tipi rilevati (12 HR+66 e 68) – tipizzazione 16 e 18 come reflex test	human histone 2
BD Onclarity HPV assay	Geni E6/E7	Tipizzazione separata 14 tipi: (16,18,31,45,51,52) e (33-58, 56-59-66,35-39-68)	β -globina umana
HPV Risk assay	Gene E7	15 tipi rilevati (12 HR+66,67 e 68) – genotipizzazione parziale 16, 18 e otherHPV	β -globina umana
Anyplex II HPV HR detection	Gene L1	14 tipi rilevati (12HR-HPV+66 e 68) con genotipizzazione dei singoli tipi	β -globina umana
Xpert HPV assay	Geni E6/E7	14 tipi rilevati (12 HR+66 e 68) – genotipizzazione parziale separata (16; 18-45; 31-35-33-52-58; 51-59; 39-56-66-68)	HMBS (idrossimetilbilano sintasi)
RealQuality RQ-HPV (AB Analitica)	Geni E6/E7	14 tipi rilevati (12 HR+66 e 68) – genotipizzazione parziale 16 e 18	β -globina umana
EUROArray HPV (EUROIMMUN)	Geni E6/E7	Genotipizzazione di 30 tipi HPV	Hsp90



Self-sampling in screening programmes using HPV primary testing

1.32 The clinical accuracy of HPV primary testing on self-collected samples taken for cervical screening is sufficient to conduct organized, population-based pilot programmes for women who have not attended screening despite a personal invitation and a personal reminder (see also Rec. 1.33 and Suppl. 2, Rec. 2.8 - 2.13) **(III)**,^{Sect 1.7}

- **Self-sampling**

2.12 Piloting self-sampling for women who did not participate in primary HPV screening despite a personal invitation and a personal reminder is recommended, provided it is conducted in an organized, population-based screening programme with careful monitoring and evaluation of the aimed performance and outcomes (see Rec. 2.8 – 2.11 and Suppl. 1, Rec. 1.32 and 1.36) **(I-A)**.^{Sect 2.4.4}

2.13 Prior to rollout towards national implementation, a self-sampling pilot project should demonstrate successful results compared to clinician-based sampling (positivity rate, positive predictive value of a positive test result, and cost-effectiveness). The pilot should also demonstrate that key organizational problems, such as the appropriate screening interval and compliance with invitation and management protocols for women with positive test results, have been adequately resolved **(III-D)**.^{Sect 2.4.4}

Validation guidelines of candidate HPV assays (comparative analysis with HC2)

Meijer et al. IntJCancer 2009

- Valutazione sensibilità clinica :
 - ≥ 60 campioni di donne arruolate in un contesto di screening di popolazione con lesioni CIN2+ individuate con hr-HC2, da solo o in combinazione con cito (Power dell'80%; se si usano ≥ 100 campioni la potenza diventa del 99%)
- Valutazione specificità clinica:
 - ritestare con il nuovo test donne di almeno 30 anni di età arruolate in un contesto di screening di popolazione già testate con HC2 in combinazione o meno con citologia e che non presentano istologia confermata CIN2+
 - ≥ 800 campioni scelti random da una popolazione più ampia (power 80%), ≥ 2500 campioni per una potenza del 99%
- Valutazione Riproducibilità inter and intra-laboratorio :
 - il test c dovrà mostrare una riproducibilità intra-laboratorio e una concordanza inter-laboratorio non inferiore al 87% :
 - almeno 500 campioni, il 30% dei quali abbia mostrato un risultato positivo con un test clinicamente validato in un laboratorio di riferimento. La riproducibilità in particolare dovrebbe essere valutata ri-testando lo stesso set di campioni alcune settimane dopo

AGGIORNAMENTO 2017



2019



Per approfondimenti fare riferimento al documento completo scaricabile sul sito del Gisci

Executive summary



ARGOMENTO	FASE DEL PERCORSO	REQUISITI
Gestione dei campioni (capitolo 3)	Prelievo	Compatibilità con 2 o più test validati Unico in fase liquida (test HPV e citologia) Doppio (test HPV e vetrino convenzionale)
	Identificativo campione e tracciabilità	Codice a barre associato in modo univoco ad anagrafica ed all'episodio di screening
	Trasporto dei campioni al laboratorio del Centro di Riferimento	3 contenitori: contenitore primario, inserito nel contenitore secondario a tenuta, a sua volta inserito nel contenitore terziario
Test molecolare HPV nello screening (capitolo 4)	Test validati per lo screening (referenza n.13)	Sensibilità e specificità clinica per lesioni CIN2+
	Esecuzione dei test	Auspicabile automazione sia della fase preanalitica che analitica
Centralizzazione Test di screening (capitolo 5)	Volumi di attività Test HPV	Auspicabile > 40.000 e fino a 100.000 o più /anno Nelle regioni di piccole dimensioni, il laboratorio centralizzato potrà effettuare un numero di test inferiori
	Volumi di attività Citologia di triage	Auspicabile la centralizzazione nello stesso centro che esegue i test HPV anche di tutti i Pap test (trriage e screening), al fine di soddisfare i requisiti previsti dalle linee-guida nazionali per i laboratori di citologia (numero minimo Pap test: 15.000/anno)
	Smaltimento dei campioni dopo test HPV	<ul style="list-style-type: none"> • HPV NEG: smaltimento dal giorno successivo alla refertazione secondo normativa vigente • HPV POS: smaltimento dopo lettura pap test triage secondo normativa vigente
	Tracciabilità del processo dalla ricezione all'invio dell'esito	Integrazione tra il gestionale di laboratorio e di screening



Executive summary

ARGOMENTO	FASE DEL PERCORSO	REQUISITI
Formazione e aggiornamento del personale (capitolo 6)	Collaborazione con altre strutture coinvolte nel programma di screening	Collaborazione regionale e/o nazionale
	Test HPV e Citologia di triage	Formazione contestualizzata allo screening. Formazione specifica per i test, le attività di laboratorio e il monitoraggio della qualità
		Partecipazione a valutazioni dei programmi in ambito nazionale/regionale
Monitoraggio qualità test HPV (capitolo 7)	Controlli Qualità Interni (CQI)	Utilizzo sistematico di campioni di controllo indipendenti (diversi da quelli presenti nel kit analitico). Fortemente consigliata la registrazione giornaliera dei valori su carte di controllo
	Valutazione esterna di qualità (VEQ)	Partecipazione a programmi di VEQ specifici per le caratteristiche che il test HR HPV ha nel programma di screening



Executive summary

ARGOMENTO	FASE DEL PERCORSO	REQUISITI
Refertazione dei test e lettera di risposta (capitolo 8)	Referto del test HPV di screening	Referto con l'esito del test HPV di screening (<i>vedi Tabella 1</i>) e con indicazione del metodo validato utilizzato
	Lettera di risposta alla donna	Deve riportare (<i>Tabella 1 del documento originale</i>): <ul style="list-style-type: none"> • i risultati di tutti i test effettuati (HPV e citologia di triage) • indicazione del centro/laboratorio che ha eseguito il test HPV (con il metodo validato utilizzato e i tipi rilevabili) e la citologia • il protocollo previsto dal programma di screening in base ai risultati
Indicatori di processo (capitolo 9)	Non conformità	Registrazione non conformità maggiori in fase: <ul style="list-style-type: none"> • Pre-analitica • Analitica • Post-analitica
	Analisi cicli di VEQ e controlli interni	Analisi dei risultati della VEQ e definizione eventuali azioni correttive Analisi statistiche mensili o trimestrali dei risultati dei controlli interni
	Indicatori epidemiologici (<i>referenza n. 19</i>)	Frequenza di test: HPV-positivi; inadeguati/smarriti; Pap di triage positivi. Tempi refertazione



La lettera di risposta deve essere semplice e facilmente comprensibile per le donne, ma al contempo deve essere esauriente per i ginecologi e gli altri operatori degli screening e non dare adito a problematiche interpretative.

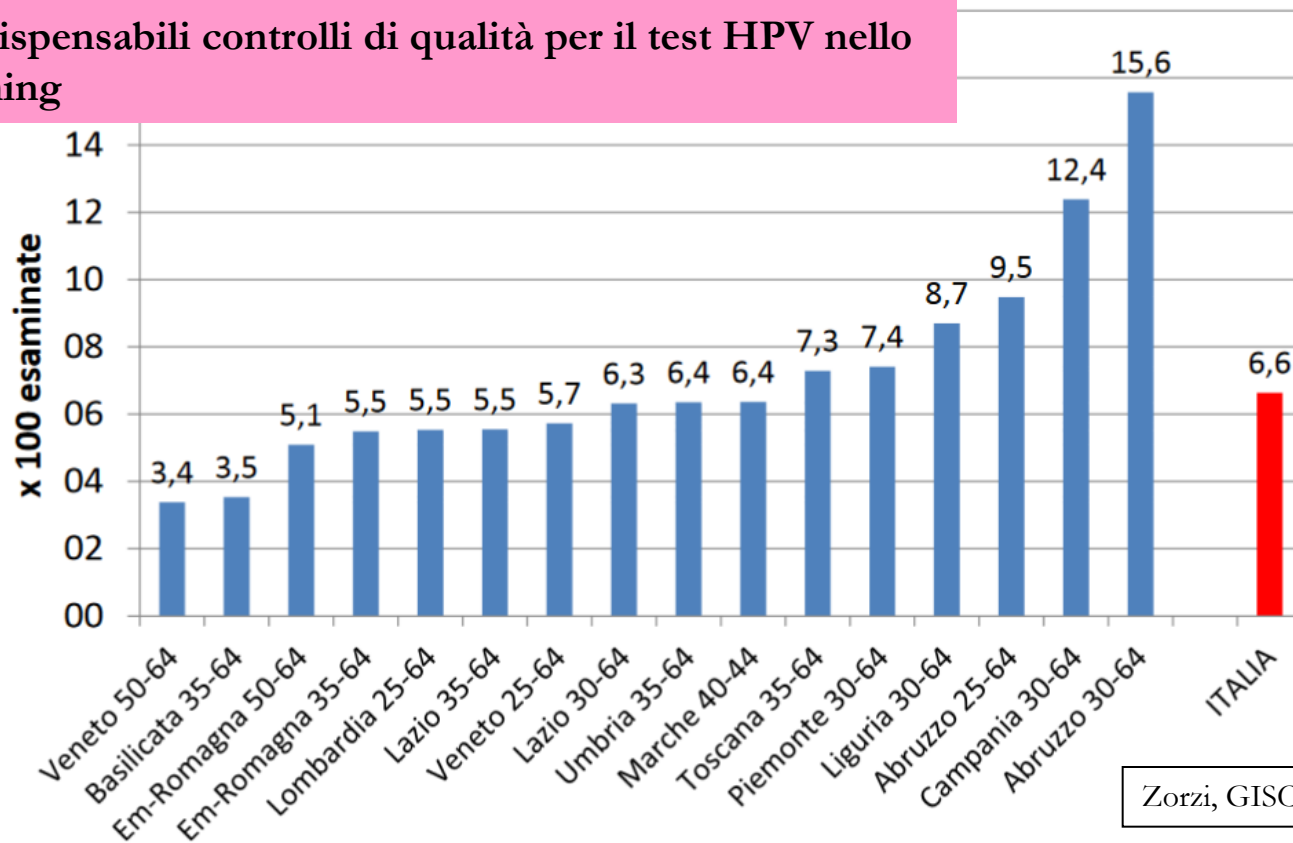
Devono essere riportati:

- i risultati di tutti i test effettuati (test HPV o test HPV e pap test di triage) ed il consiglio clinico che ne deriva
- il laboratorio in cui è stato effettuato il test HPV e il laboratorio dove è stato letto il pap test di triage
- il metodo 'validato per lo screening' utilizzato per la ricerca di HPV
- l'elenco dei tipi HPV che il metodo può individuare

Positività al test HPV tutte le età Survey 2016

Test HPV validati per lo screening:

- diversa prevalenza per età
 - diversa prevalenza nelle diverse aree/città
- indispensabili controlli di qualità per il test HPV nello screening



Zorzi, GISCI Roma 2018

BUON LAVORO