

Test HPV DNA: i test HPV validati per i programmi di screening

F.Gargiulo

1° edizione lunedì 13 novembre
2° edizione martedì 28 novembre
3° edizione venerdì 15 dicembre



Il carcinoma cervicale è la prima neoplasia a essere riconosciuta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come totalmente riconducibile ad un'infezione.

Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer

Fact sheet

Updated June 2016

Cervical cancer is by far the most common HPV-related disease.

Nearly all cases of cervical cancer can be attributable to HPV infection.

Premio Nobel per la Medicina 2008

Luc Montagnier, Françoise Barré Sinossi, Harald zur Hausen

Al tedesco Harald zur Hausen va il grande merito di essere stato il primo studioso, in un articolo pubblicato nel 1976, a ipotizzare che alcuni ceppi del Papillomavirus umano (HPV) fossero responsabili del tumore della cervice uterina.

Non era mai stata supposta prima l'origine virale di una neoplasia.

Il comitato Nobel ha definito "antidogmatica" l'ipotesi di zur Hausen, che «ha portato alla caratterizzazione della storia naturale dell'infezione da HPV, alla comprensione del meccanismo della carcinogenesi HPV-indotta e allo sviluppo di vaccini profilattici contro il contagio da HPV»

Caratteristiche del virus

Famiglia: *Papillomaviridae* Genere: *Papillomavirus*

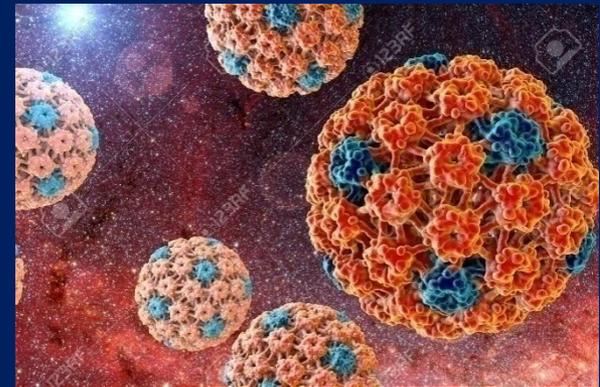
Genoma: dsDNA, circolare (episoma), ~8.000 bp

Capside: icosaedrico, diametro 52-55 nm

2 proteine strutturali:

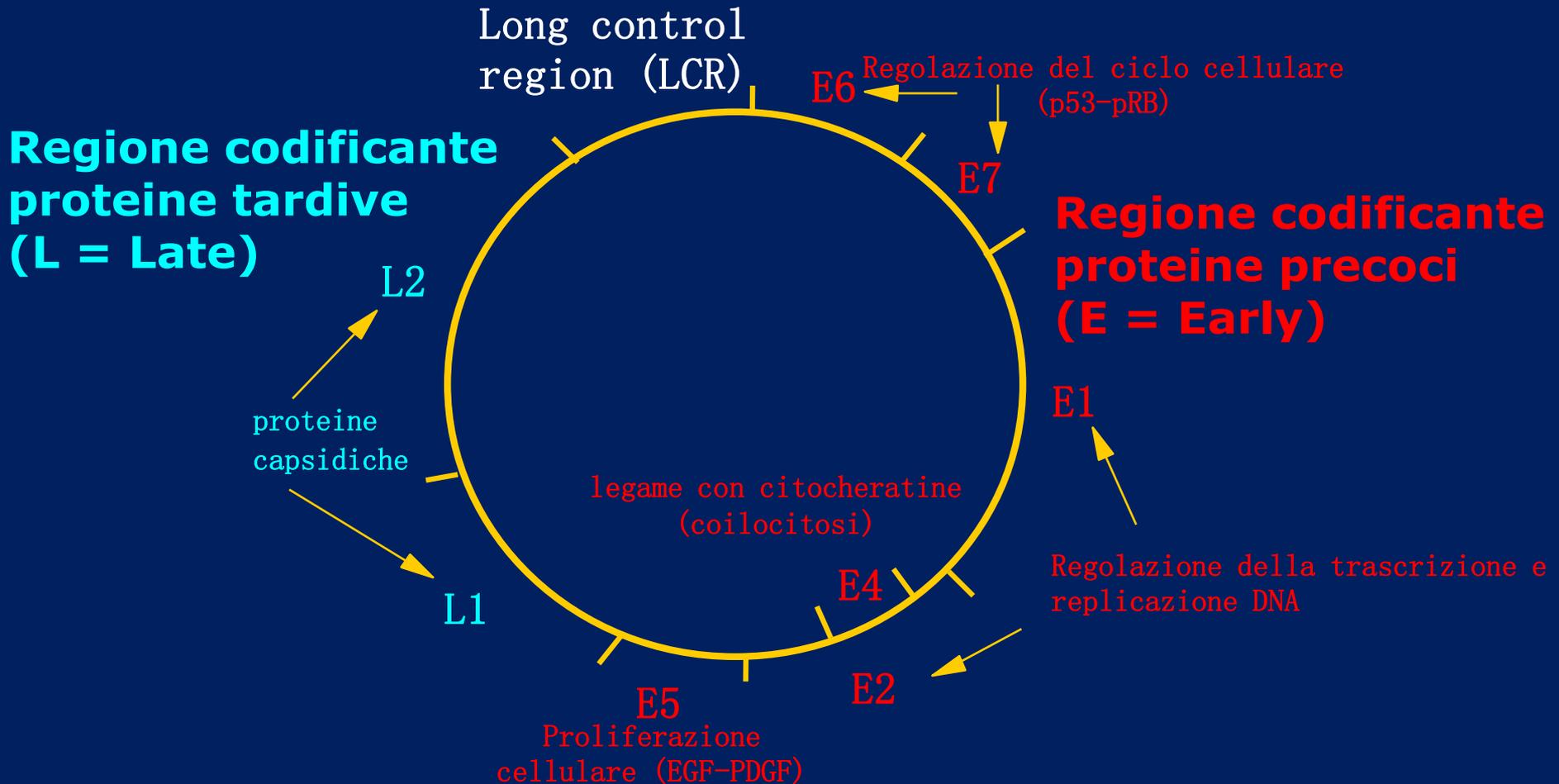
L1 proteina capsidica maggiore peso molecolare di 55 kd rappresenta l'80% delle proteine capsidiche:

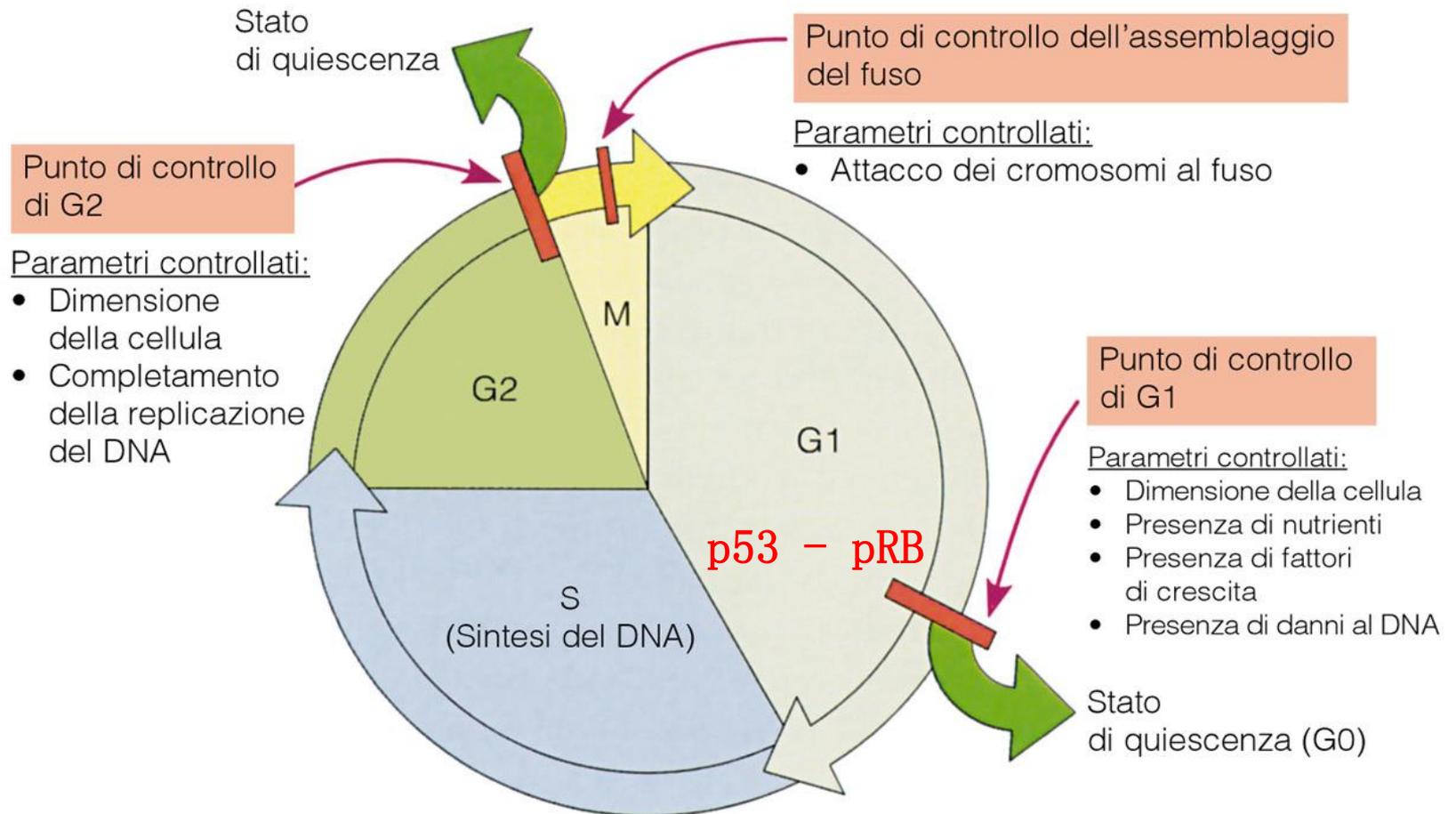
- legame ai recettori cellulari
- formulazione di vaccini
- tipizzazione virale



L2 proteina capsidica minore peso molecolare di 70 kd rappresenta il restante 20% delle proteine capsidiche

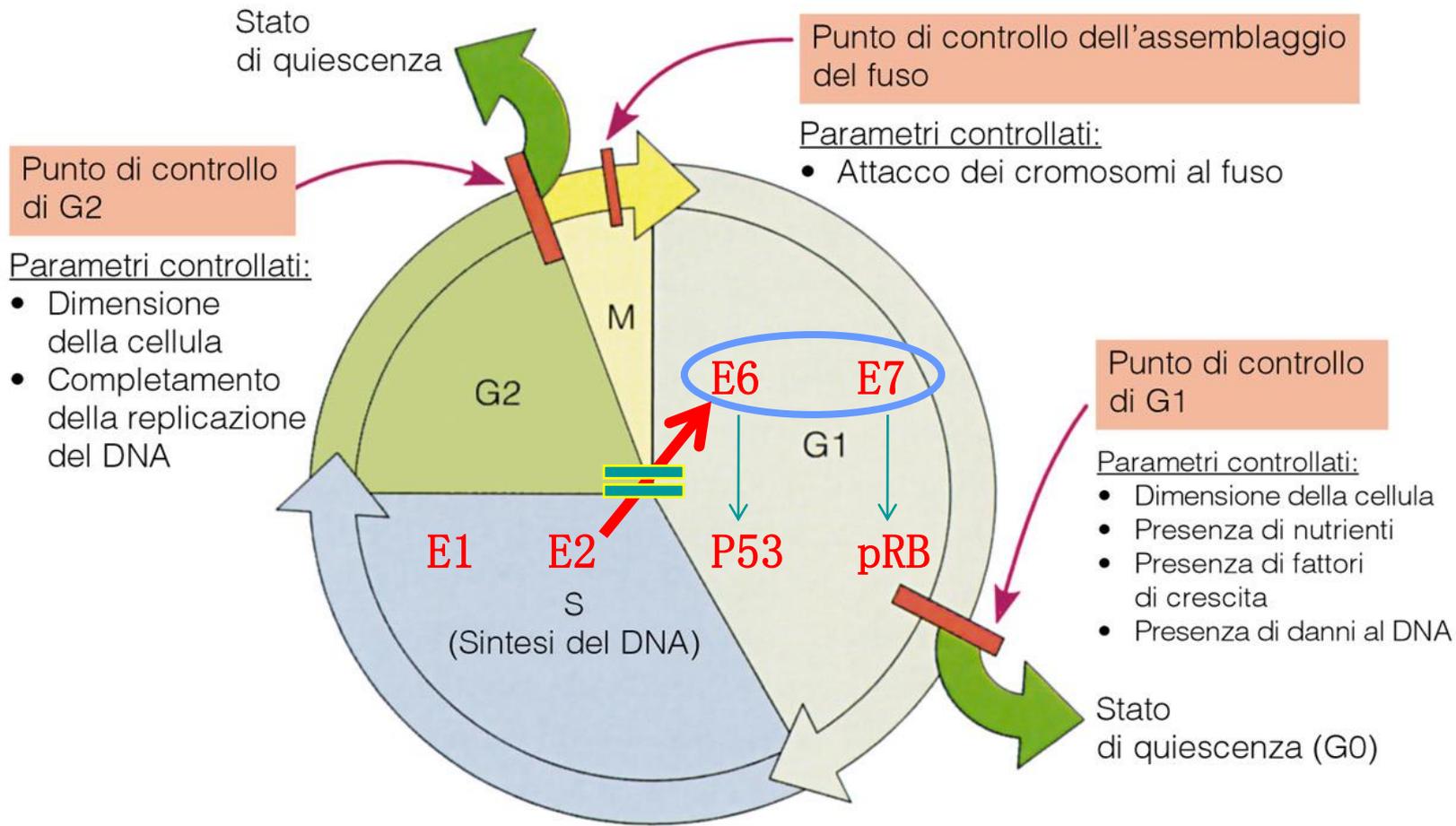
Organizzazione del genoma





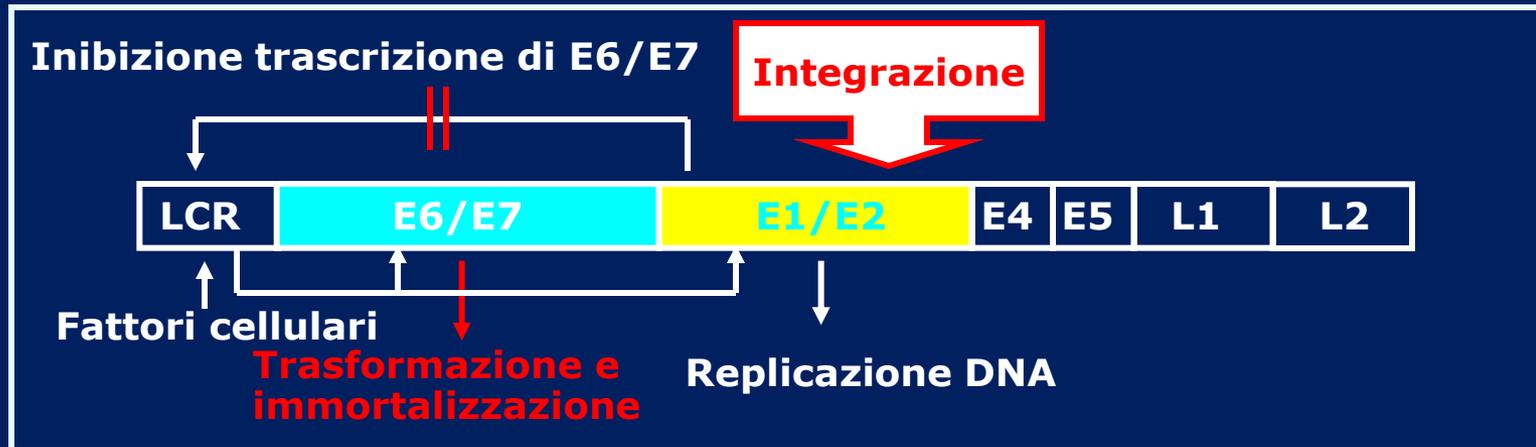
Funzioni dipendenti dalla concentrazione di proteine antitumorali p53 e pRB:

- arresto della cellula in fase G1
- riparazione del DNA danneggiato
- induzione di apoptosi (morte cellulare)



Trasformazione

L'episoma è un elemento genetico che può integrarsi attraverso un processo di ricombinazione in un cromosoma dell'organismo ospite



Accumulo di mutazioni
Instabilità del genoma cellulare
Divisione della cellula ospite incontrollata
Perdita della capacità di differenziazione
Immortalizzazione
Cancro

Classificazione IARC (International Agency for Research on Cancer) dei genotipi HPV in base al loro potenziale oncogeno:

- GRUPPO 1 (Agente carcinogeno per l'uomo):
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
- GRUPPO 2A (Agente probabile carcinogeno per l'uomo):
68
- GRUPPO 2B (Possibile Agente carcinogeno per l'uomo):
26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 87
- GRUPPO 3 (Agenti non classificabili come carcinogeni):
6, 11, 42, 43, 44, 54, 55

La D.g.r. 9 gennaio 2015 - n. X/3003 "Avvio del percorso per l'implementazione dell'utilizzo del test per la ricerca del DNA del papilloma virus umano (HPV-DNA test) come test primario per la prevenzione del tumore della cervice uterina



BANDO PER LA FORNITURA DI SISTEMI DI PRELIEVO, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DI CAMPIONI CERVICO-VAGINALI

Il campione prelevato viene immerso e risciacquato in un flacone contenente 20mL di terreno di trasporto PreservCyt® (ThinPrep™).

La soluzione con campione citologico per il ThinPrep Pap Test deve essere conservata a 15 °C – 30 °C e i campioni devono essere analizzati entro 6 settimane dal prelievo.

BANDO PER LA **FORNITURA DI SISTEMI DIAGNOSTICI** PER LA
DETERMINAZIONE DI HPV DNA IN CAMPIONI CERVICO VAGINALI

CARATTERISTICHE **TECNICHE MINIME** RICHIESTE AI SISTEMI DIAGNOSTICI
IN GARA

- COMPLETA AUTOMAZIONE SIA NELLA FASE PRE-ANALITICA CHE NELLA FASE ANALITICA (MASSIMO UN INTERVENTO DELL'OPERATORE)
- PRELIEVO AUTOMATICO DAL CONTENITORE CON UN VOLUME MASSIMO DI 5 ML CON GARANZIA DI INTEGRITA' DEL CONTENITORE E DEL CAMPIONE RESIDUO
- COMPLETA TRACCIABILITA' DEL PERCORSO ANALITICO

CARATTERISTICHE **MINIME DI ACCURATEZZA** RICHIESTE AI SISTEMI
DIAGNOSTICI IN GARA

***(indicazioni GISCi - ONS Gruppo Italiano Screening del
Cervicocarcinoma - Osservatorio Nazionale Screening)***

- RILEVAZIONE DEI 12 TIPI DI HPV DEFINITI AD ALTO RISCHIO ONCOGENICO DALLA INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). CONSENTITA L'INCLUSIONE DI HPV 66 E HPV 68. LA POSITIVITA' PER ALTRI TIPI VIRALI E' CAUSA DI ESCLUSIONE
- PER LESIONI CIN2+ SENSIBILITA' NON INFERIORE AL 90% E SPECIFICITA' NON INFERIORE AL 98% RISPETTO AL TEST HC2
- RIPRODUCIBILITA' INTRA-LABORATORIO NON INFERIORE A 87%

Tabella 1 del Rapporto N.2

Test HPV clinicamente validati al 29 dicembre 2016

TEST VALIDATO (NOME ABBREVIATO)	PRODUTTORE	METODOLOGIA	REFERENZE BIBLIOGRAFICHE degli STUDI DI VALIDAZIONE, area geografica, tipo di studio e mezzo di prelievo utilizzato negli studi di validazione	NOTE e COMMENTI
Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA test (HC2)	Qiagen, USA	Ibridizzazione con amplificazione del segnale	Test di riferimento usato in molti studi clinici randomizzati, compreso NTCC	
GP5+/6+ PCR-EIA (GP5+/6+ EIA)	Diassay, Olanda	PCR	Test di riferimento usato nel trial POBASCAM	
RealTime High Risk HPV test (Abbott RT hrHPV test)	Abbott, Germania	Real-time PCR	Carozzi et al, 2011 – Italia – retrospettivo / STM Poljak et al, 2011 – Slovenia – prospettico/ThinPrep Hesselink et al, 2013 – Olanda – retrosp. / non specificato	Test completamente validato. Risultati concordanti nei tre studi.
Cobas 4800 HPV test (Cobas 4800)	Roche, USA	Real-time PCR	Heideman et al, 2011 – Olanda – retrosp. / UCM Lloveras et al, 2013 – Spagna – retrosp. / ThinPrep	Test completamente validato. Risultati concordanti nei due studi.
PapilloCheck HPV-screening test (PapilloCheck)	Greiner Bio-One, Germania	Tecnologia PCR – chip	Hesselink et al, 2010 – Olanda – retrosp. / PBS Heard et al, 2016 – Olanda – retrosp. / ThinPrep	Test completamente validato per la versione con 14 tipi di HPV.
Cervista HPV HR test (Cervista)	Hologic, USA	Tecnologia invader	Boers et al, 2014 – Cina, Olanda – prosp. / ThinPrep Alameda et al, 2015 –Portogallo–retrosp. / ThinPrep	Test completamente validato.
BD Onclarity HPV assay (BD Onclarity)	BD Diagnostics, USA	Real-time PCR	Ejegod et al, 2014 – Danimarca, Inghilterra – retrosp. / ThinPrep Cuschieri et al, 2015 – Scozia – retrosp. / ThinPrep Ejegod et al, 2016 – Danimarca – retrosp. SurePath	Test completamente validato.
HPV-Risk assay (HPV-Risk assay)	Self-Screen, Olanda	Real-time PCR	Hesselink et al, 2014 – Olanda – prosp. / ThinPrep	Test completamente validato.
Anyplex II HPV HR Detection (Anyplex II)	Seegene, Korea	Real-time PCR	Hesselink et al, 2016 – Olanda – retrosp. / ThinPrep Jung et al, 2016 – Korea – retrosp. / Huro Path	Test completamente validato.
Xpert HPV assay (Xpert)	Cepheid, USA	Cartridge-based real-time PCR assay	Cuschieri et al, 2016 – Scozia, Inghilterra - retrosp. / ThinPrep	Test completamente validato.

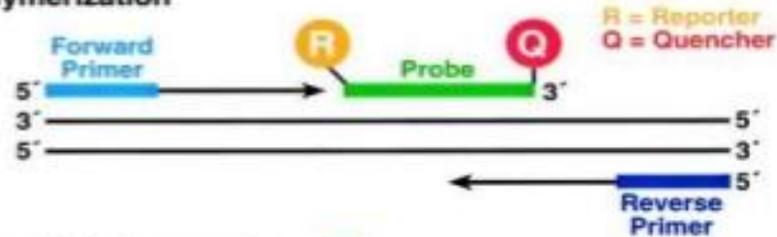
*STM = Standard Transport Medium, Qiagen ThinPrep (TP) = PreservCyt, Hologic SurePath (SP) = BD Diagnostics PBS = Phosphate-Buffered Saline
UCM = Universal Collection Medium Huro Path = Huro Path solution, CelltraZone

Roche

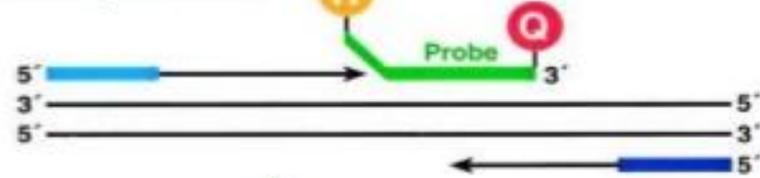
HPV-DNA

Real-time PCR

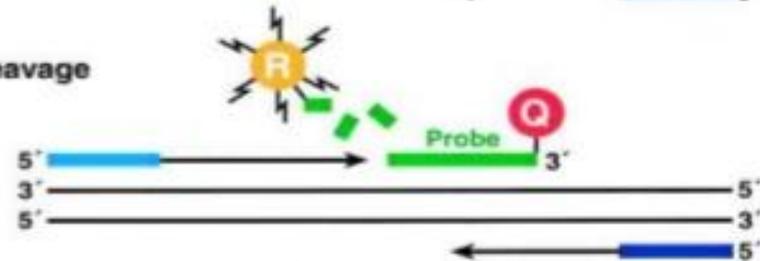
Polymerization



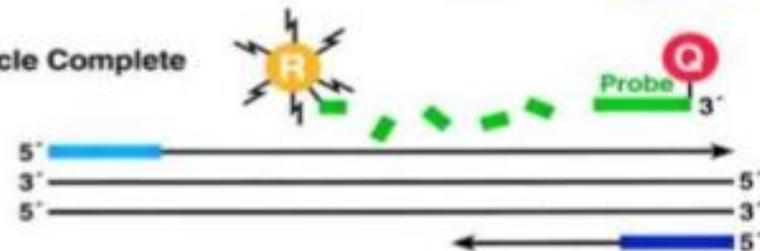
Strand Displacement



Cleavage



Cycle Complete





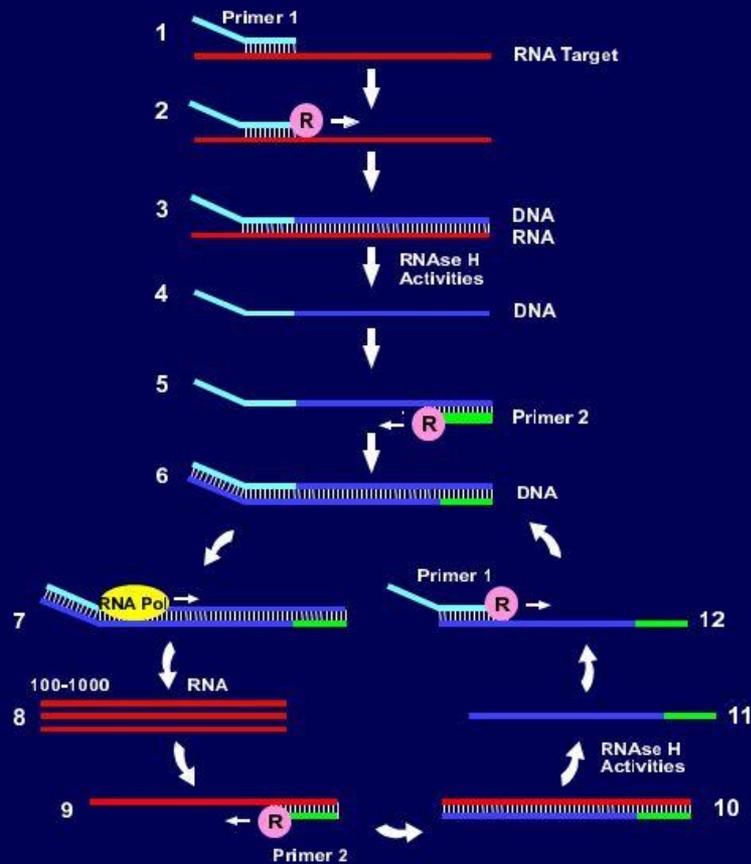


- Il test consente l'identificazione qualitativa del **DNA virale del gene L1** di 12 genotipi in pool e di HPV 16 e HPV 18 separatamente
- Offre un controllo mediante co-amplificazione di un gene umano per valutare la presenza di cellule nel campione
- Offre un sistema enzimatico per la prevenzione delle contaminazioni

Hologic

HPV-RNA_m

Transcription-Mediated Amplification





- Il test consente l'identificazione qualitativa dell'RNA messaggero (mRNA) virale E6/E7 di 14 genotipi in pool e di HPV 16 e HPV 18/45 separatamente mediante un test reflex
- Non offre un controllo mediante co-amplificazione di un gene umano per valutare la presenza di cellule nel campione
- Offre un sistema chimico per la prevenzione delle contaminazioni

CONTROLLI DISPONIBILI NEI SISTEMI DIAGNOSTICI MOLECOLARI

- Controllo positivo e negativo

- Controllo di qualità interno

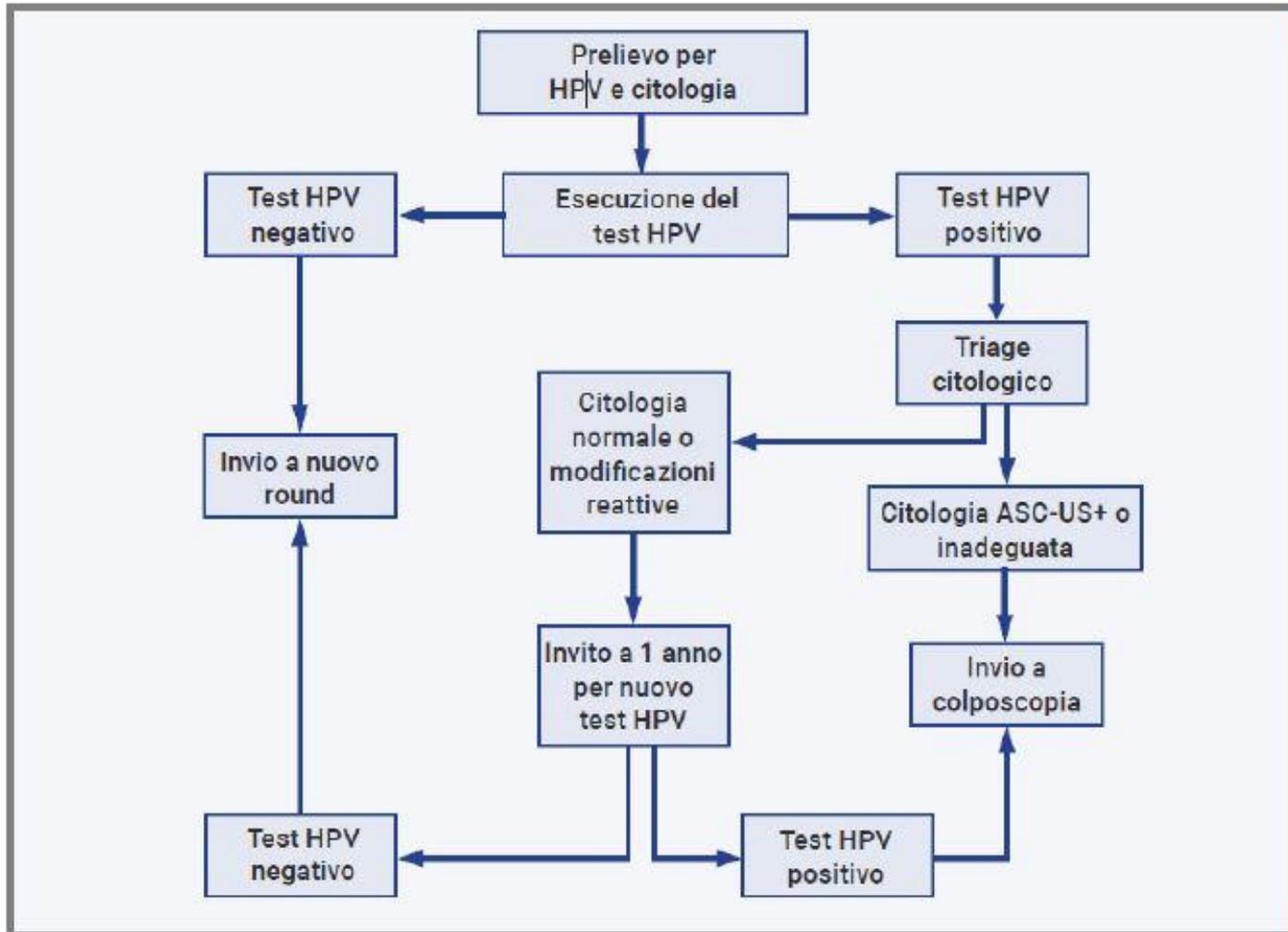
- Controllo interno (inibizione dell'enzima)

Se al momento del prelievo del campione sono presenti elevate concentrazioni di sangue o di pomate anti-fungine o spermicidi o lavande vaginali esiste la possibilità di avere falsi negativi.

- **Controllo della presenza cellule nel campione**

In assenza di cellule esiste la possibilità di avere falsi negativi

ALGORITMO PREVISTO CON INTRODUZIONE DEL HPV DNA TEST COME TEST DI SCREENING PRIMARIO



VALORE PREDITTIVO

Nella pratica clinica esprime la probabilità di diagnosi corretta del test:

- Se il test è positivo, quanto è probabile che la persona abbia davvero la malattia?

Questa informazione è data dal valore predittivo positivo (VPP) e corrisponde alla proporzione di pazienti con un test positivo che hanno la malattia, quindi diagnosticati correttamente come malati

- Se il test è negativo, quanto è probabile che la persona non abbia la malattia?

Questa informazione è data dal valore predittivo negativo (VPN) e corrisponde alla proporzione di pazienti con un test negativo che non hanno la malattia, quindi diagnosticati correttamente come sani

Valore predittivo negativo (NPV) e positivo (PPV) del test HPV-DNA per il carcinoma cervicale

- La ricerca di HPV non identifica alcuna forma di displasia cervicale
- La presenza di HPV è condizione necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo di tumore cervicale

HPV NEGATIVO: virtualmente nessun rischio di sviluppo di tumore cervicale (NPV > 98%)

HPV POSITIVO: la maggior parte delle infezioni regredisce spontaneamente (PPV < 30%)

HPV-DNA vs HPV-RNA

FOLLOW UP IN PAZIENTI TRATTATE PER DISPLASIA DELLA CERVICE UTERINA. (43 test)

RNA - Hologic Aptima HPV test

DNA - Fujirebio INNO-LIPA HPV Genotyping Extra II

Test per l'amplificazione, la rivelazione e l'identificazione su strip dei 32 principali genotipi di HPV ano-genitali (regione L1)

- Rivelazione di 32 genotipi virali: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 70, 73, 81, 82, 83, 89
- Co-amplificazione e rivelazione di un gene umano come riferimento per il controllo di adeguatezza cellulare, estrazione, amplificazione e rivelazione

➤ 38 test concordanti di cui 20 negativi

➤ 5 test positivi ad alto rischio per DNA negativi per RNA

Discordanti sul totale 12%. Discordanti sui positivi 22%.

ASCUS nei Pap test spontanei (8 test)

RNA - Hologic Aptima HPV test

Cepheid Xpert HPV

Test pcr real time multiplex (regioni E6 e E7) di 14 tipi di HPV ad alto rischio ed identifica separatamente HPV 16, HPV 18/45 ed altri 11 tipi combinati in altri 3 gruppi distinti.

Co-amplificazione e rivelazione di un gene umano come riferimento per il controllo di adeguatezza cellulare, estrazione, amplificazione e rivelazione

- 6 test concordanti di cui 4 negativi
- 2 test positivi ad alto rischio per DNA negativi per RNA

Discordanti sul totale 25%. Discordanti sui positivi 50%.

Considerazioni sui due test in gara per i programmi di screening

- La D.g.r. 9 gennaio 2015 - n. X/3003 "Avvio del percorso per l'implementazione dell'utilizzo del test per la ricerca del DNA del papilloma virus umano (HPV-DNA test) come test primario per la prevenzione del tumore della cervice uterina
- I test HPV-DNA E HPV-RNA non sono equivalenti per la valutazione dell'infezione da HPV:
 - HPV-DNA (anche infezioni latenti) screening
 - HPV-RNA (solo infezioni produttive) follow-up
- Il test HPV-RNA manca del controllo di co-amplificazione per la valutazione della presenza di cellule nel campione
- Confronto dei dati a livello nazionale ed internazionale solo con HPV-DNA

Grazie per l'attenzione