



Il Modello adottato dalla Regione Emilia Romagna

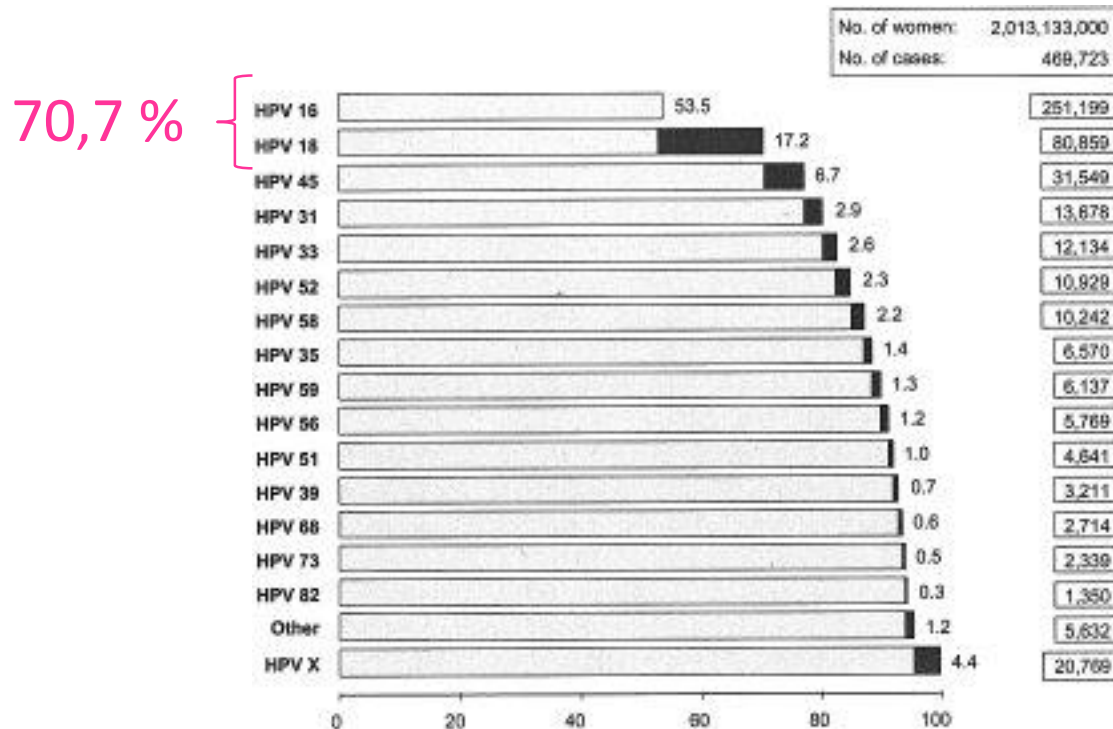


VITTORIO SAMBRI

U.O.C. MICROBIOLOGIA - CENTRO SERVIZI AUSL DELLA ROMAGNA



GENOTIPI HPV E CARCINOMA DELLA CERVICE



Munoz N *et al. Int J Cancer* 2004; 111: 278–85.

HPV-DNA come screening primario ?

Abstract

BACKGROUND: In four randomised trials, human papillomavirus (HPV)-based screening for cervical cancer was compared with cytology-based cervical screening, and precursors of cancer were the endpoint in every trial. However, direct estimates are missing of the relative efficacy of HPV-based versus cytology-based screening for prevention of invasive cancer in women who undergo regular screening, of modifiers (eg, age) of this relative efficacy, and of the duration of protection. We did a follow-up study of the four randomised trials to investigate these outcomes.

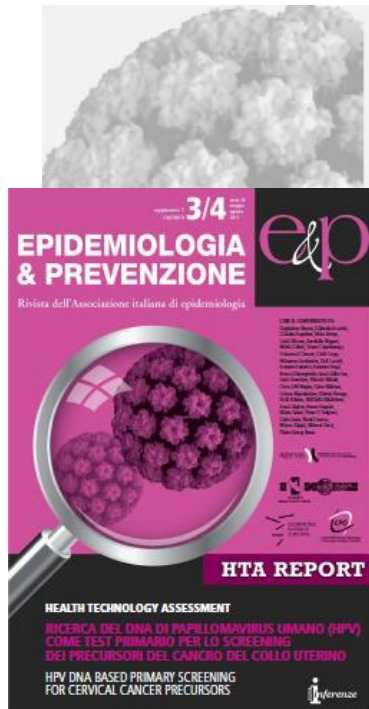
METHODS: 176,464 women aged 20-64 years were randomly assigned to HPV-based (experimental arm) or cytology-based (control arm) screening in Sweden (Swedescreen), the Netherlands (POBASCAM), England (ARTISTIC), and Italy (NTCC). We followed up these women for a median of 6.5 years (1,214,415 person-years) and identified 107 invasive cervical carcinomas by linkage with screening, pathology, and cancer registries, by masked review of histological specimens, or from reports. Cumulative and study-adjusted rate ratios (experimental vs control) were calculated for incidence of invasive cervical carcinoma.

FINDINGS: The rate ratio for invasive cervical carcinoma among all women from recruitment to end of follow-up was 0.60 (95% CI 0.40-0.89), with no heterogeneity between studies ($p=0.52$). Detection of invasive cervical carcinoma was similar between screening methods during the first 2.5 years of follow-up (0.79, 0.46-1.36) but was significantly lower in the experimental arm thereafter (0.45, 0.25-0.81). In women with a negative screening test at entry, the rate ratio was 0.30 (0.15-0.60). The cumulative incidence of invasive cervical carcinoma in women with negative entry tests was 4.6 per 10(5) (1.1-12.1) and 8.7 per 10(5) (3.3-18.6) at 3.5 and 5.5 years, respectively, in the experimental arm, and 15.4 per 10(5) (7.9-27.0) and 36.0 per 10(5) (23.2-53.5), respectively, in the control arm. Rate ratios did not differ by cancer stage, but were lower for adenocarcinoma (0.31, 0.14-0.69) than for squamous-cell carcinoma (0.78, 0.49-1.25). The rate ratio was lowest in women aged 30-34 years (0.36, 0.14-0.94).

INTERPRETATION: HPV-based screening provides 60-70% greater protection against invasive cervical carcinomas compared with cytology. Data of large-scale randomised trials support initiation of HPV-based screening from age 30 years and extension of screening intervals to at least 5 years.

Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM et al. Efficacy of HPV based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of our European randomised controlled trials. *Lancet* 2014;383:524-32.

HPV-DNA come screening primario



ELEMENTI ESSENZIALI DI UN PROTOCOLLO APPROPRIATO

■ Le donne positive ad HPV non devono essere inviate direttamente a colposcopia, ma è necessario utilizzare sistemi di triage.

Il metodo attualmente raccomandabile è basato sull'esecuzione della citologia (Pap test) nelle donne HPV positive:

- se il test risulta anormale, la donna viene inviata immediatamente a colposcopia;
- se la citologia è negativa, la donna viene invitata a eseguire un nuovo test HPV a distanza di un anno.
 - Nel caso tale test desse ancora esito positivo, la donna verrà inviata a colposcopia;
 - in caso negativo, la donna verrà invitata a un nuovo round di screening entro gli intervalli previsti.
- **L'intervallo di screening** nell'ambito di programmi organizzati di popolazione dopo un test HPV primario negativo **deve essere di almeno 5 anni**. Ci sono prove che il rischio di CIN di alto grado fino a 5 anni dopo un test HPV negativo è inferiore a quello fino a 3 anni dopo una citologia normale; la probabilità di colposcopie e trattamenti inutili sarebbero, invece, plausibilmente rilevanti con intervalli triennali dopo test HPV negativo.
- **Lo screening basato sul test HPV non deve iniziare prima dei 30-35 anni**. Ci sono prove che sotto i 30 anni lo screening basato sul test HPV conduce a sovradiagnosi di CIN2 che sarebbero regredite spontaneamente, con il conseguente rischio di sovratrattamento. Inoltre, qualche sovradiagnosi è plausibile anche tra 30 e 34 anni; al di sotto di questa età, si raccomanda lo screening citologico.
- **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, benché, rispetto al solo test HPV, esso comporti un incremento della sensibilità, peraltro non rilevante. Determina, invece, un sostanziale incremento dell'invio a colposcopia e minore valore predittivo positivo dello stesso. Per questo motivo, nel caso si utilizzi il test HPV come test primario, si raccomanda di non aggiungere la citologia in parallelo.

HPV-DNA come screening primario



PROTOCOLLO DIAGNOSTICO TERAPEUTICO DELLO SCREENING PER LA PREVENZIONE DEI TUMORI DEL COLLO DELL'UTERO NELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA

V edizione – Anno 2014

Alcuni grandi trial di popolazione condotti in Europa hanno dimostrato che il test HPV è più sensibile del Pap test; il follow up di questi studi ha poi dimostrato che tale maggiore sensibilità si traduce in maggiore anticipazione diagnostica delle lesioni preinvasive, infine in una maggior efficacia nella prevenzione del cancro invasivo.

Alla luce di questi risultati molti progetti pilota hanno iniziato a valutare la fattibilità di programmi di screening organizzati basati sull'HPV come test di screening primario.

I risultati di questi studi hanno portato alla revisione delle linee guida sullo screening della cervice uterina: in marzo 2012 sono state pubblicate le nuove linee guida dell'American Cancer Society che raccomandano lo screening con HPV a partire dai 30 anni con intervallo quinquennale da preferirsi rispetto al Pap test triennale; a maggio 2012 la US Preventive Services Task Force ha pubblicato linee guida con raccomandazioni simili; in luglio 2012 è stato pubblicato il report HTA italiano che anticipa le indicazioni delle linee guida europee, le raccomandazioni del report sono state adottate dal ministero della Salute, sentito il parere della Commissione Sanità della Conferenza Stato Regioni, come strumento di supporto alle Regioni per la programmazione dello screening della cervice uterina.

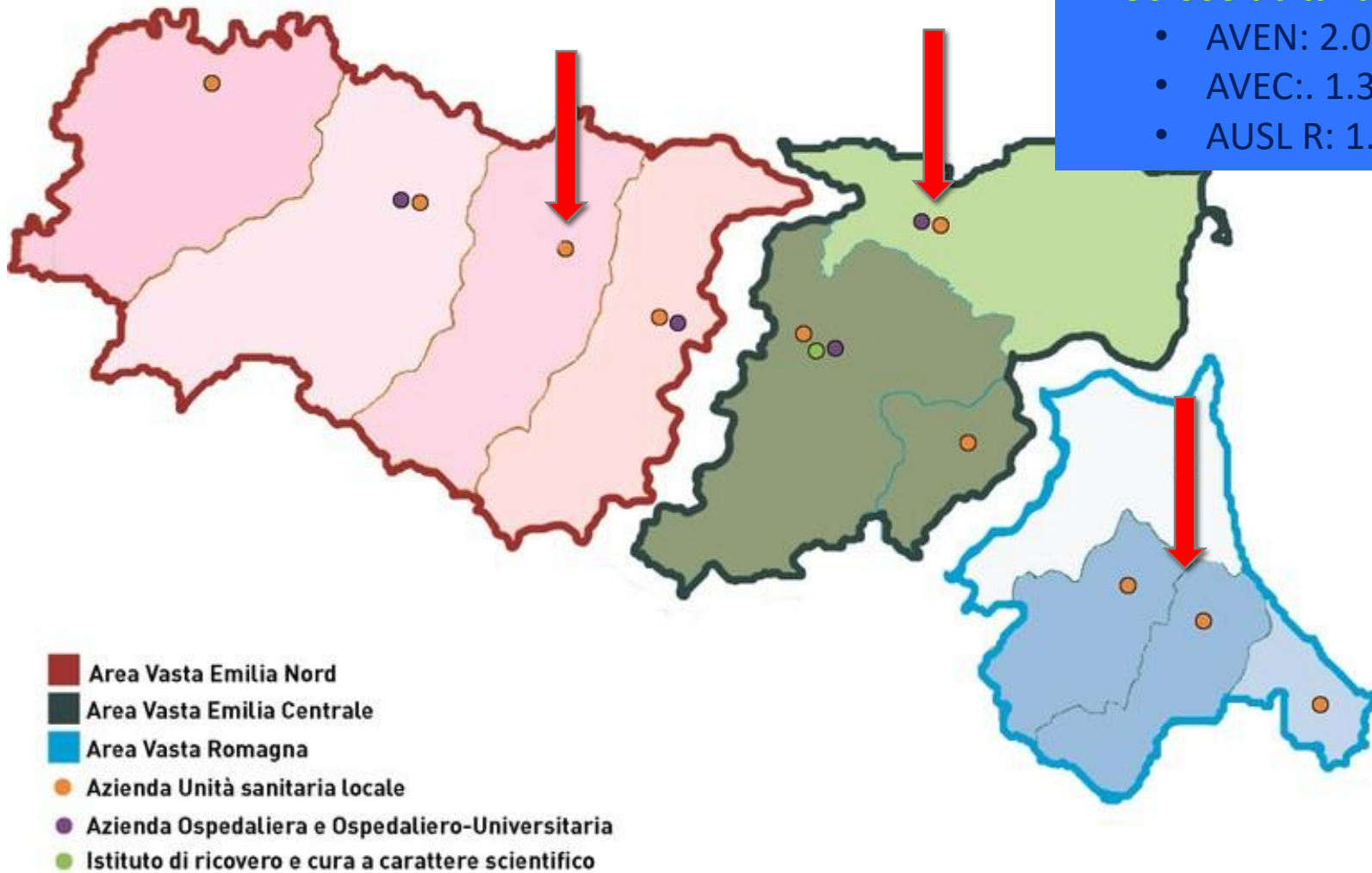
L'effettuazione del test HPV nell'ambito del programma di screening della Regione Emilia-Romagna sarà centralizzata in tre laboratori, uno per ogni Area Vasta (AVEN, AVEC e Romagna).



LABORATORI HPV RER

4.450.000 abitanti

- AVEN: 2.000.000
- AVEC.: 1.350.000
- AUSL R: 1.100.000



HPV-DNA Test

▪ Donne 25-29 anni: pap-test come test primario

➔ Nell'ASC-US, che presenta un Valore Predittivo Positivo (VPP 5%) molto basso per lesioni di alto grado, ma che rappresenta più del 50% delle anomalie citologiche al Pap test, si applica il Triage mediante test HPV DNA.

➔ Tenuto conto del risultato dello studio NTCC e delle evidenze scientifiche internazionali validate e già ricordate, nel caso in cui il test risulti negativo le pazienti non vengono inviate in colposcopia ed effettuano un controllo dopo tre anni.

Nel caso in cui il test HPV sia positivo, la donna va inviata in colposcopia.

▪ Donne 30-64 anni: HPV test come test primario

Per le donne dai 30 ai 64 anni di età il test primario di screening è il test HPV DNA. Il prelievo è effettuato in un mezzo liquido che permetta sia la ricerca del DNA virale sia l'allestimento di un vetrino per la citologia in strato sottile.

Da questo campione viene presa un'aliquota per effettuare la ricerca del DNA dei ceppi HPV ad alto rischio oncogeno.

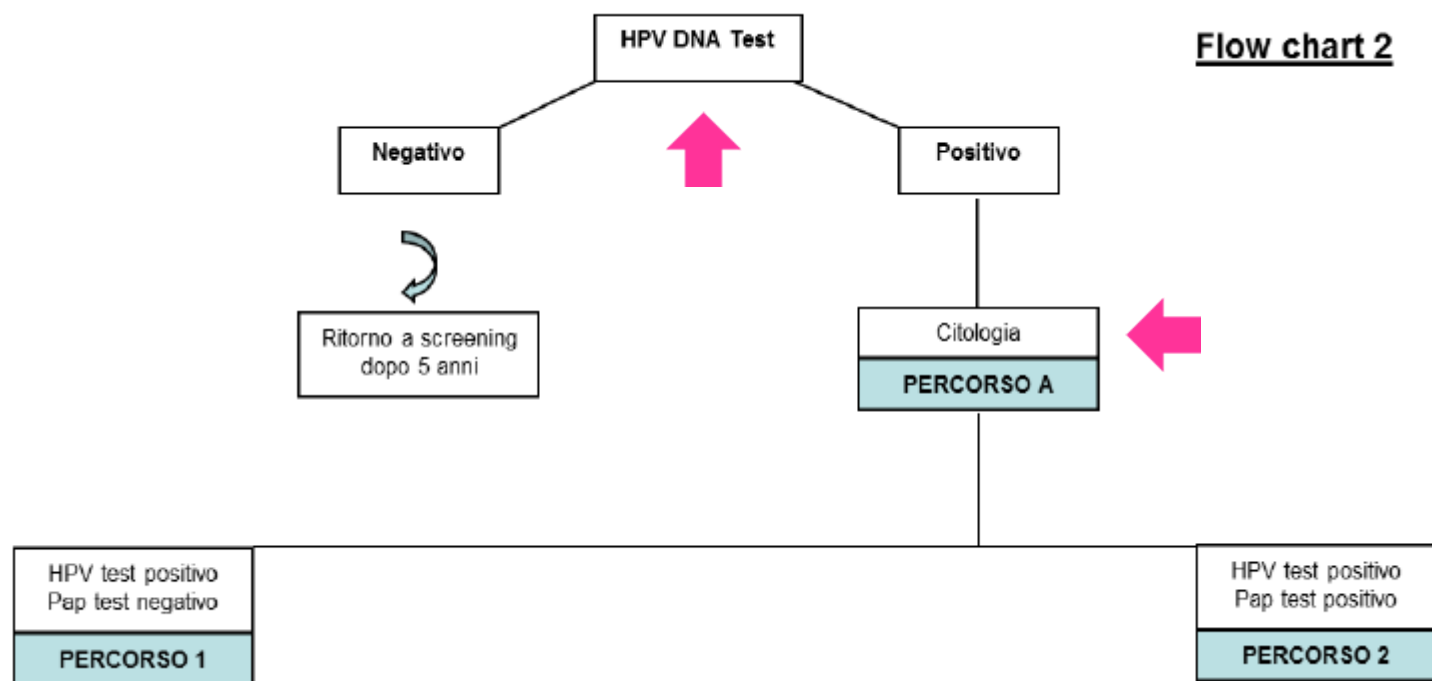
➔ Le donne che risultano negative al test vengono re-invitate per il successivo round di screening dopo 5 anni.

➔ Per le positive al test viene allestito il vetrino in strato sottile e letta la citologia: nel caso la citologia sia positiva la donna viene invitata immediatamente a fare una colposcopia; nel caso la citologia sia negativa la donna viene invitata a ripetere il test HPV dopo un anno; le donne con citologia inadeguata vengono invitate a ripetere il Pap test, e qualora la donna non si presentasse per la ripetizione del Pap test, verrà re-invitata dopo un anno ad effettuare il test HPV, il risultato sarà interpretato alla luce anche del precedente test positivo.

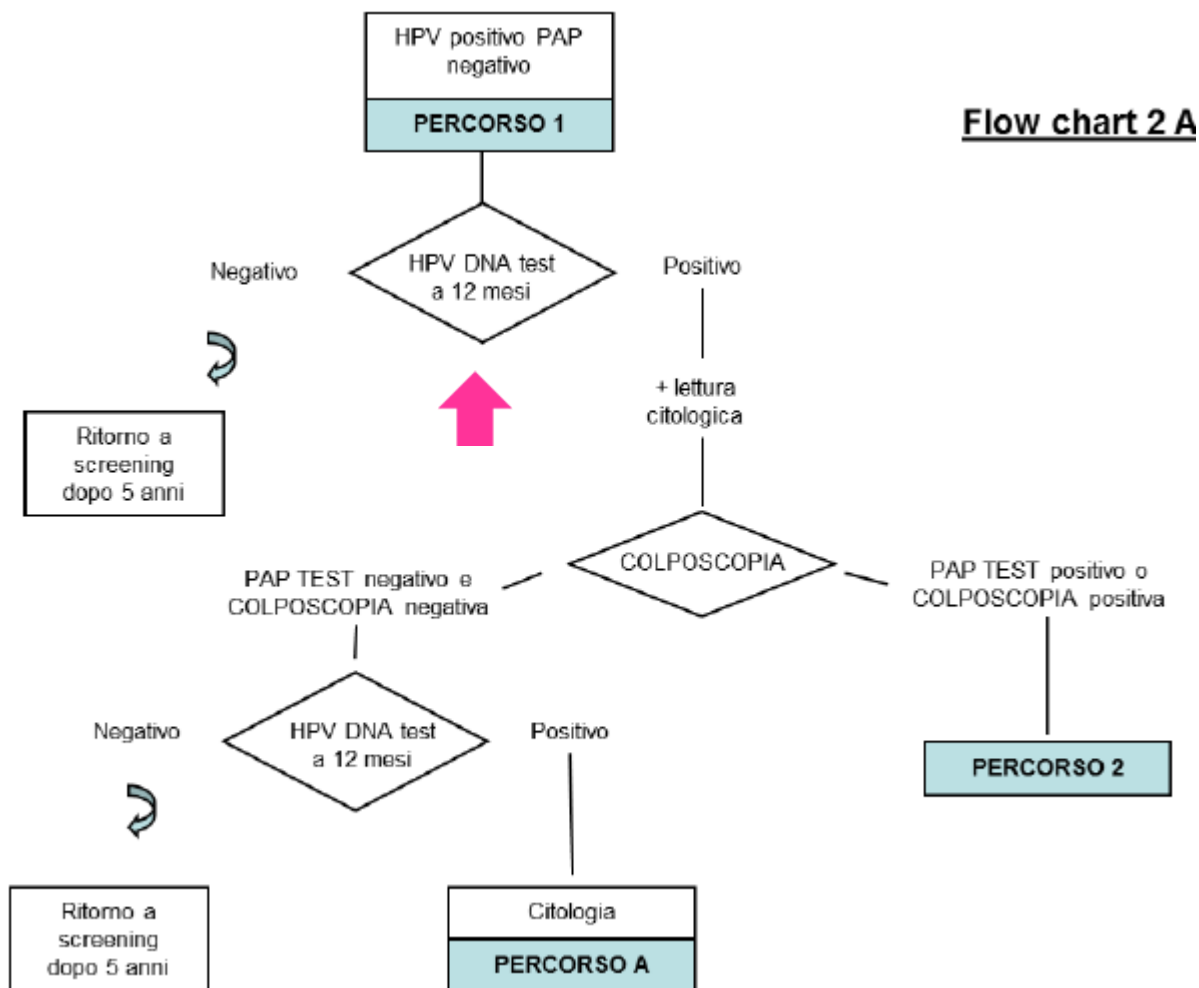
▪ Follow-up

➔ Il test HPV è inoltre utilizzato nel triage delle lesioni ASC-US (nelle donne 25-29 anni) e nel corso del follow up post accertamenti di secondo livello negativi per CIN2+ e post trattamento.

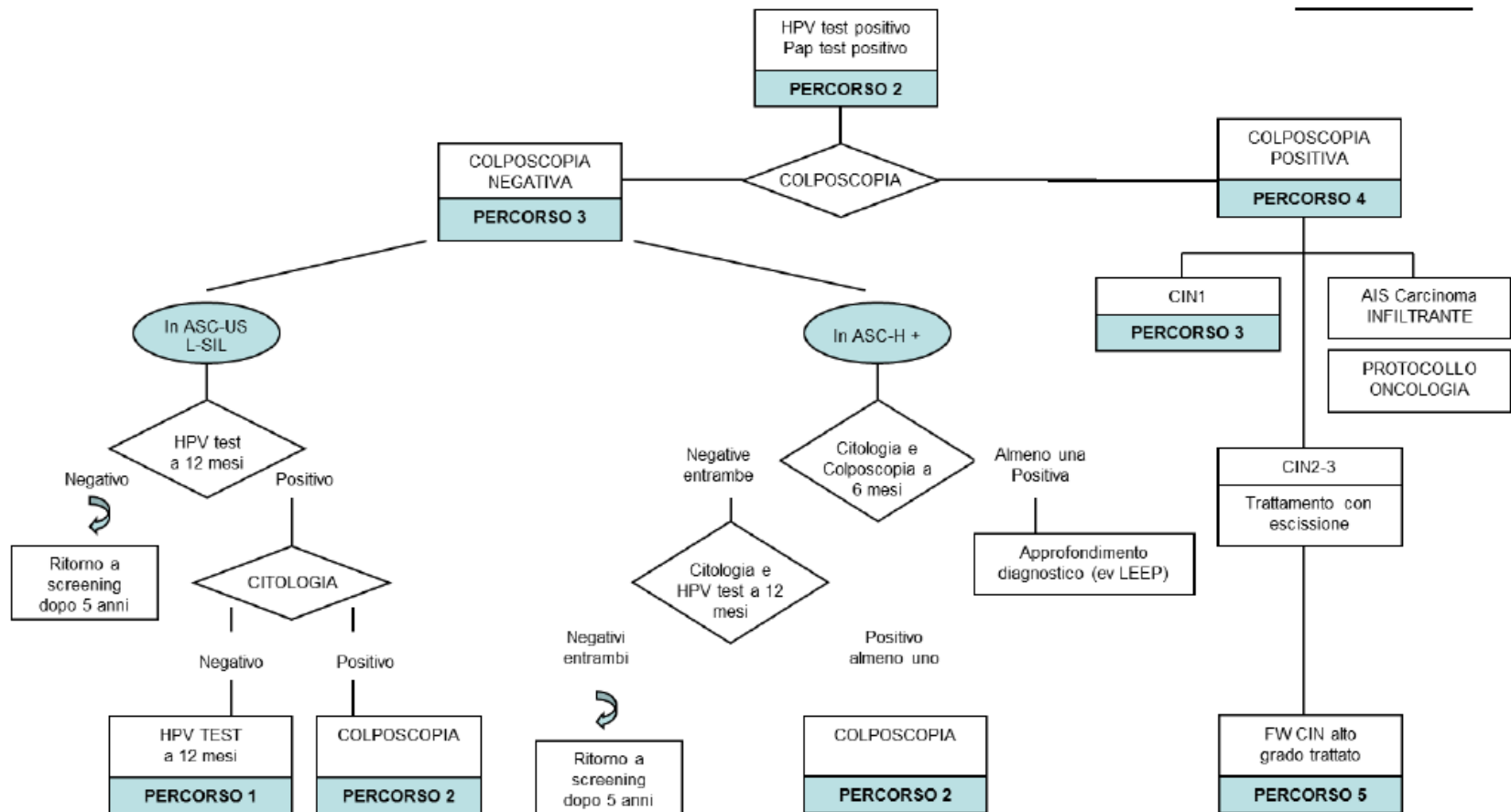
Donne 30-64 anni: HPV-DNA come test primario



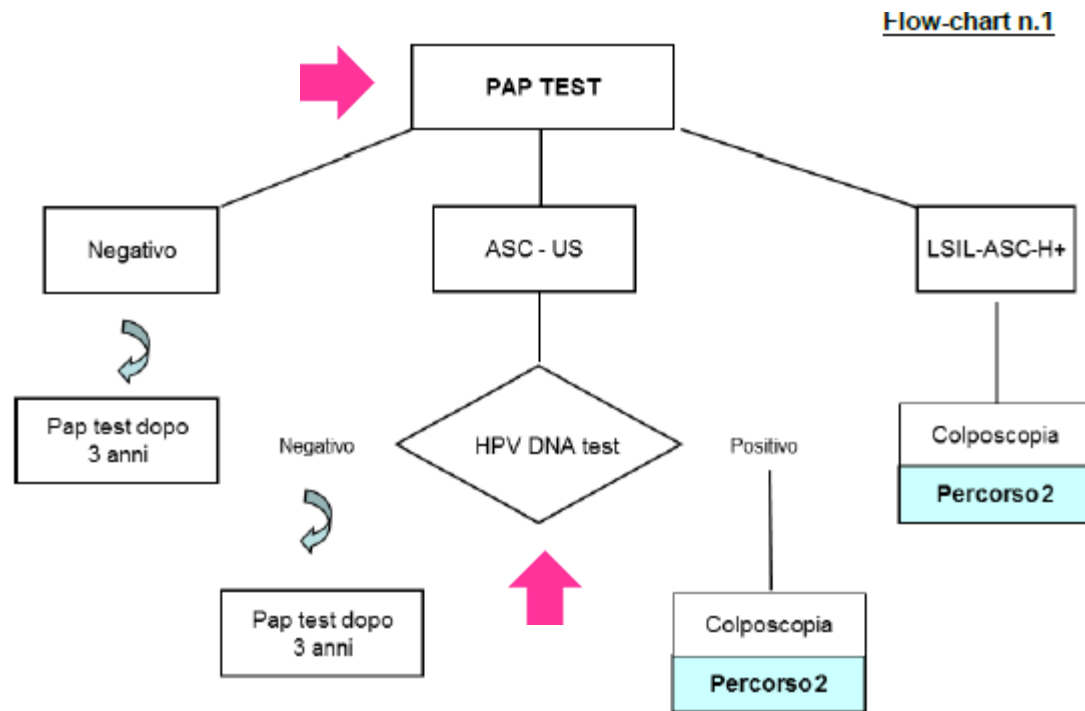
Donne 30-64 anni: HPV-DNA come test primario



Donne 30-64 anni: HPV-DNA come test primario



Donne 25-29 anni: pap-test come test primario

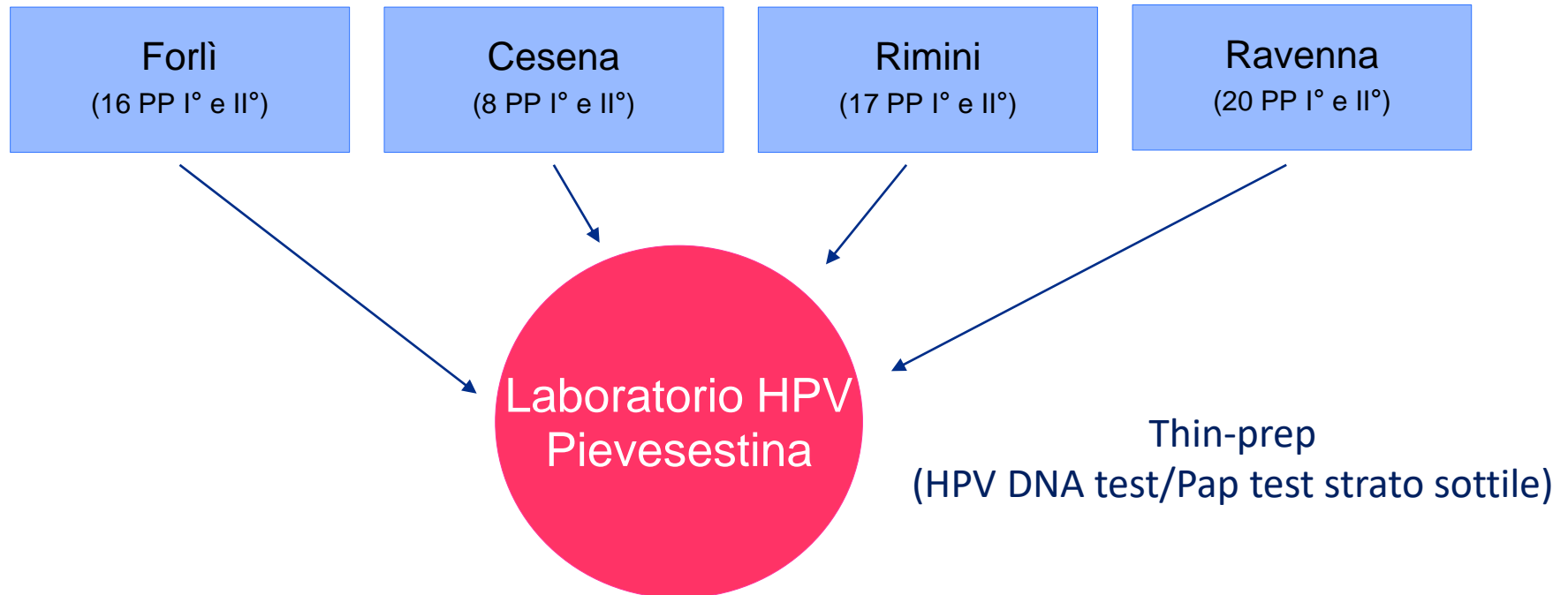


LA FASE DI TRANSIZIONE

	Fasce età	Tipo di test	Donne da invitare per anno				
			attuale	1° anno	2° anno	3° anno	4° anno
situazione attuale	25-64	Pap test	420.620				
2016 →	1° anno round transizione	50-64 HPV		156.803			
		30-49 Pap test		220.992			
		25-29 Pap test		44.928			
2017 →	2° anno round transizione	46-64 HPV			211.378		
		30-45 Pap test			168.061		
		25-29 Pap test			45.500		
2018 →	3° anno round transizione	41-64 HPV				280.163	
		30-40 Pap test				101.575	
		25-29 Pap test				45.811	
4° anno	30-64 HPV						247.339
	25-29 Pap test						46.542
Totale			420.620	422.723	424.939	427.549	293.881

La programmazione degli inviti durante il round di transizione dovrà seguire le scadenze già programmate. L'intervallo per le donne che risultano negative al test HPV sarà invece di 5 anni, mentre rimane triennale l'intervallo per le donne che risultano negative al Pap test quando effettuato come test primario.

LABORATORIO HPV PIEVESESTINA



ALLESTIMENTO LABORATORIO

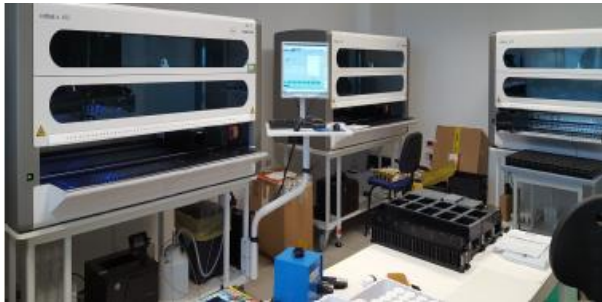
Laboratorio HPV
Pievesestina

1. Cambio destinazione d'uso →
2. Separazione degli ambienti:
 - a) Laboratorio
 - b) Stanza dei microscopi



STRUMENTAZIONE

- Sistema COBAS ROCHE (p480, 2 x480, 2 z480)



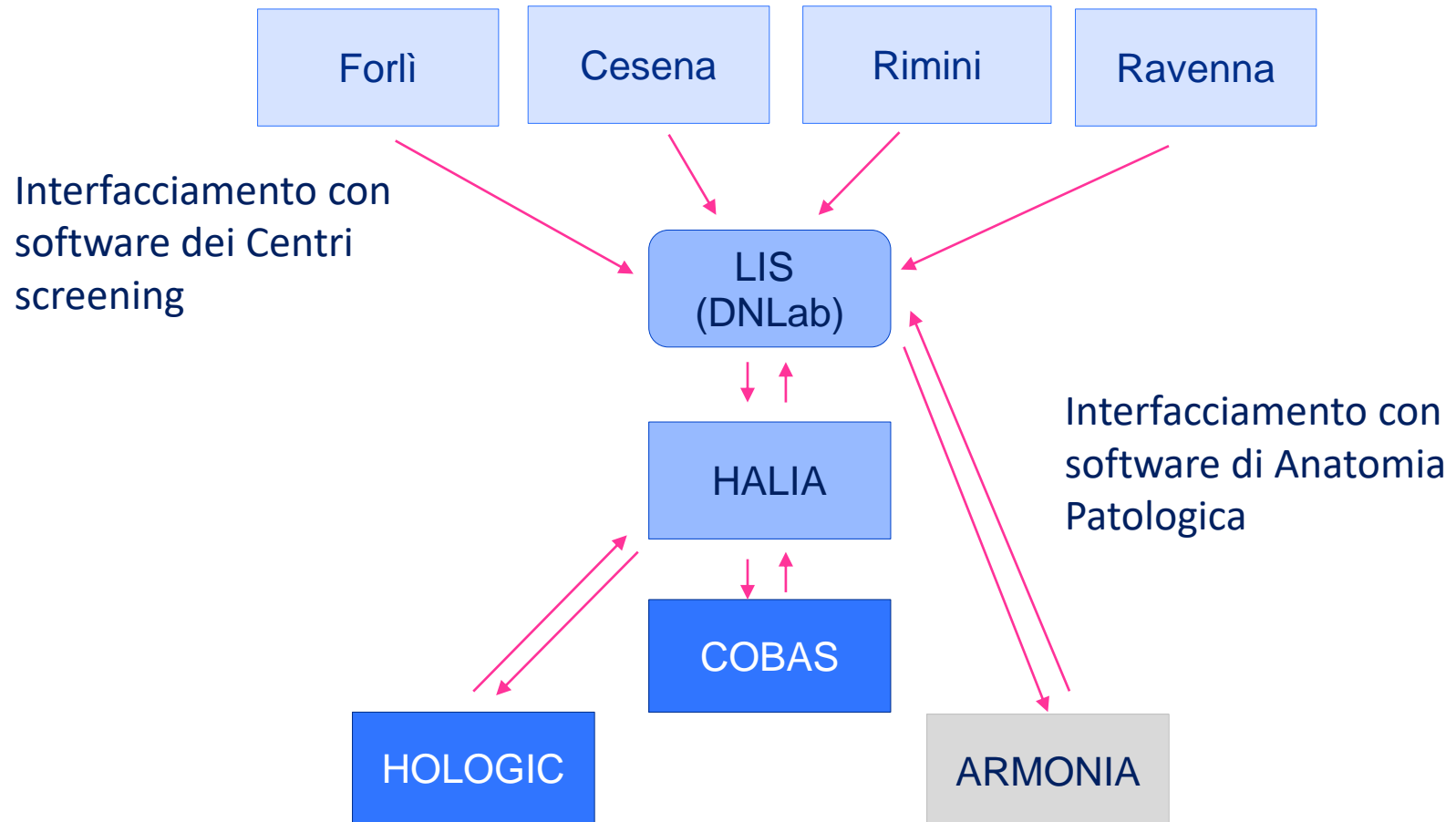
- Sistema HOLOGIC (ThinPrep 5000)

- Coloratore

- Montavetrini SAKURA (Olympus)



FLUSSO INFORMATICO



CODICI DI CONVOCAZIONE

Laboratorio HPV
Pievesestina



1cr	Codice di convocazione .Lettera che identifica il tipo di esame da refertare
1cr	Numero che indica se il campione proviene da un centro di primo o di secondo livello
1cr	Codice centro screening (FO=1;CE=2;RN=3;RA=4)
2cr	Numero che indica le ultime due cifre dell'anno del prelievo
5cr	Numero che indica il progressivo del campione

Codice	Test	Percorso
H1	<ul style="list-style-type: none"> • HPV → Pap test se HPV positivo 	Screening primario (30-64 anni)
H2	<ul style="list-style-type: none"> • HPV → Pap test se HPV positivo 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Controllo a 12 mesi dopo HPV positivo e Pap test negativo ○ Follow-up
H3	<ul style="list-style-type: none"> • HPV → Pap test se HPV positivo 	Controllo a 12 mesi dopo HPV positivo (di nuova introduzione)
C2	<ul style="list-style-type: none"> • HPV • Pap test 	<ul style="list-style-type: none"> ○ follow up a 18 mesi da ASCH+ ○ follow up percorso post trattamento per HPV neg e pap ASCUS/L-SIL/CIN1 ○ follow up percorso post trattamento per HPV pos e pap ASC-H +
K1/K2	<ul style="list-style-type: none"> • HPV 	<p>K1 - dopo ASCUS in Pap-test tradizionale nella fase di transizione</p> <p>K2 - dopo AGC di 1° livello + colpo</p>
P2	<ul style="list-style-type: none"> • Pap test 	Controllo a 6 mesi dopo HPV (H1) positivo, ASC-H + e colposcopia negativa
Q1	<ul style="list-style-type: none"> • Pap test → HPV se Pap test positivo 	Screening primario (25-29 anni)

Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update

Mario Poljak*, Boštjan J. Kocjan, Anja Oštrbenk, Katja Seme

Journal of Clinical Virology 76 (2016) S3–S13

With such an exceptionally high number of commercial HPV tests on the market, alpha-HPVs are currently still among most attractive microbial targets for molecular diagnostic companies.

Unfortunately, today's HPV test global market is one of the most confusing and least regulated, and with most divergent diagnostic products on the market, sometimes colloquially described as the "Wild West."



In addition, we can predict with high certainty that the number and diversity of commercial HPV tests will continue to increase over the next 5 years due to the promising marketing opportunities for manufacturers around the world.



110/193 (57.0%) of HPV tests on the market in 2015 had at least one publication in peer-reviewed literature as of August 31, 2015. However, only 69/193 (35.7%) of HPV tests on the market in 2015 had a documented performance evaluation (analytical and/or clinical) in peer-reviewed literature as of August 31, 2015 in contrast to the remaining 41 HPV tests, for which only descriptive studies can be found in the literature.





GISCI

Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma

TEST HPV VALIDATI PER LO SCREENING DEL CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA

- **Documento di presentazione**

- attività e modalità di lavoro

- **Rapporto di aggiornamento N. 3**

29 dicembre 2017

cobas[®] 4800 HPV test

- Test **QUALITATIVO** per la rilevazione in vitro di **HPV-DNA** mediante **PCR real-time**.
- Identifica in modo specifico i tipi **HPV16** e **HPV18** e contestualmente **altri HPV-HR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52,56, 58, 59, 66 e 68)**.
- Convalida **CE IVD** per la determinazione di **livelli di infezione clinicamente rilevanti** per la definizione di **rischio oncogeno** in campioni **cervicali in fase liquida**.

CAMPIONI

Raccolti e conservati nel terreno di trasporto campioni **PreservCyt® (ThinPrep™)**

 **ATTENZIONE ai campioni ematici !**

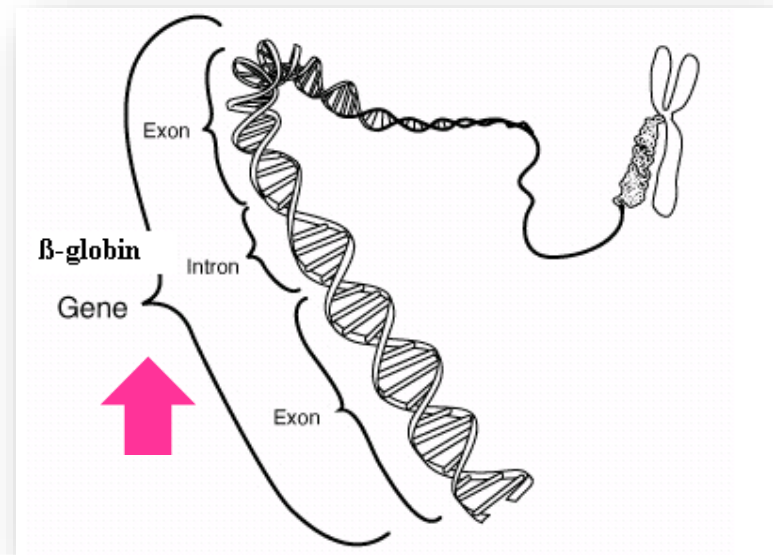


- Stabili a **2-30°C** per un massimo di **6 mesi**.
- La stabilità del campione per l'allestimento del Pap-test è **6 settimane**

IL CONTROLLO INTERNO

Il test amplifica e rileva anche il gene della **β -globina umana (330 bp)**

- Verificare la **presenza di cellule** nel campione
- Verifica i passaggi di **estrazione ed amplificazione**



CARICAMENTO CAMPIONI E REATTIVI

- Test eseguito a partire dai **contenitori primari**
- **Apertura automatica** dei contenitori
- Riconoscimento del **bar-code**
- Acquisizione della **programmazione** tramite collegamento al **LIS**

- **Reattivi pronti all'uso**

I RISULTATI

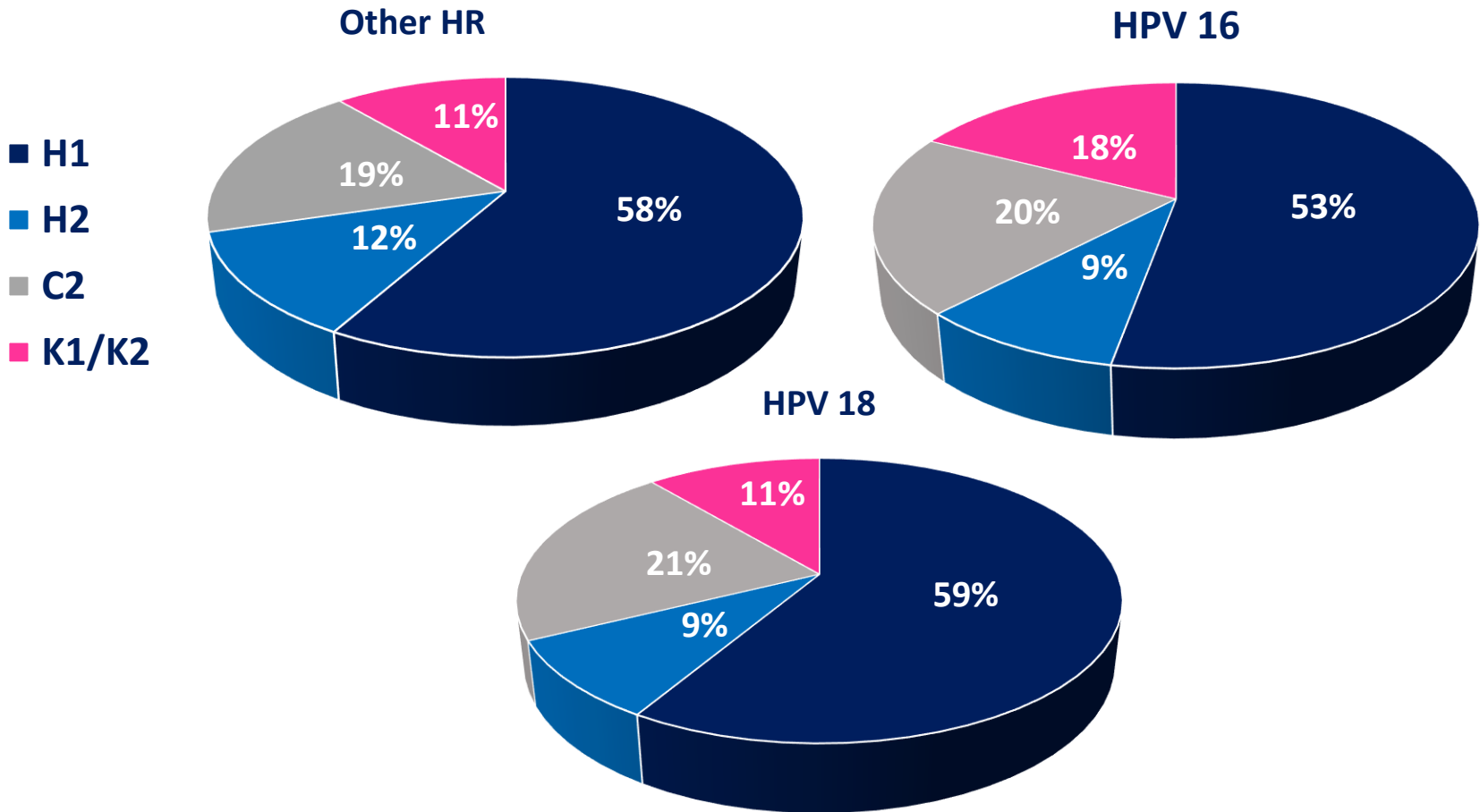
Test cobas [®] 4800 HPV	Report e interpretazione dei risultati
<u>Test secondario "HPV High Risk Panel":</u>	
HR HPV POS	Positivo per HPV ad alto rischio Il campione è risultato positivo per il DNA di uno, o più, tra i seguenti tipi di HPV ad alto rischio: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.
HR HPV NEG	Negativo per HPV ad alto rischio* Il DNA di HPV tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 non è rilevabile o è presente in concentrazioni inferiori al limite soglia.
Invalid	Non valido per HPV ad alto rischio I risultati non sono validi. Il campione originale deve essere analizzato di nuovo per ottenere un risultato valido.
Failed	Nessun risultato per il campione Consultare il Manuale Operativo del sistema cobas [®] 4800 per istruzioni sull'interpretazione dei flag e le azioni consigliate. Il campione originale deve essere analizzato di nuovo per ottenere un risultato valido.

Anche se rare, le mutazioni nella regione altamente conservata del DNA genomico del Papillomavirus umano coperta dai primer e/o dalle sonde del test cobas[®] 4800 HPV possono ostacolare la corretta identificazione del DNA virale.

Interpretazione dei risultati del test cobas[®] 4800 HPV per pazienti con anomalie citologiche

Risultati	Interpretazione
Other HR HPV* NEG, HPV16 NEG, HPV18 NEG	Basse probabilità di neoplasia sottostante \geq CIN2.
Other HR HPV* POS, HPV16 NEG, HPV18 NEG	Maggiori probabilità di rilevare una neoplasia sottostante \geq CIN2 in fase di colposcopia.
HPV16 POS e/o HPV18 POS	Altissime probabilità di rilevare una neoplasia sottostante \geq CIN2 in fase di colposcopia ^{34,35} .

GENOTIPI



VEQ E CQI

A. Programmi VEQ

- UK NEQAS
- INSTAND
- ISPRO (Istituto per lo Studio, la Prevenzione e la rete Oncologica)

B. CQI

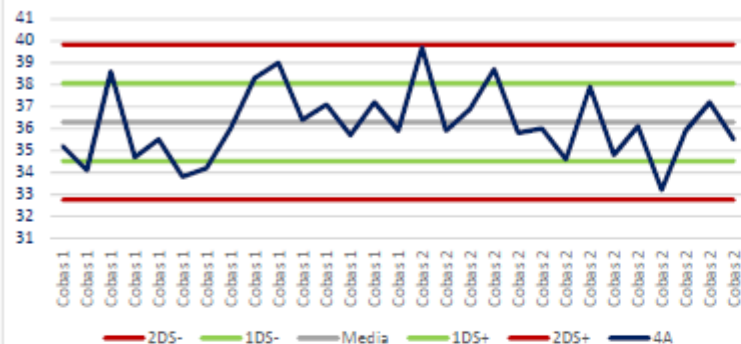
- Accurun Seracare

ACCURUN

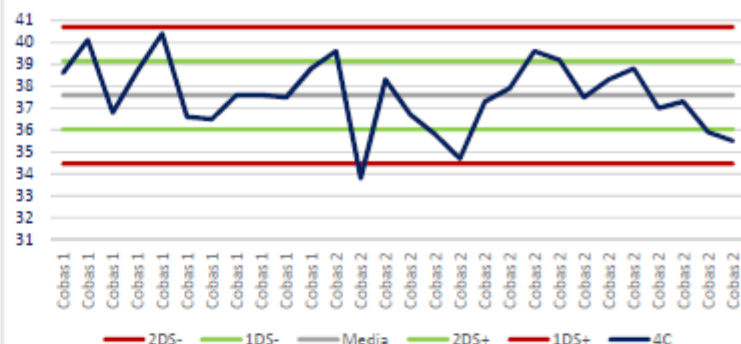
ACCURUN 372 Series 600 is formulated for use with laboratory tests that detect Human Papillomavirus (HPV) DNA in human cervical samples. ACCURUN 372 Series 600 is manufactured from cultured human epithelial cells (SiHa) containing an integrated genome of HPV type 16. SiHa cells are mixed with non-infected cultured human cells and suspended in solution. Vial of diluent also supplied.

➔ Inserito in OGNI seduta analitica, in posizione variabile

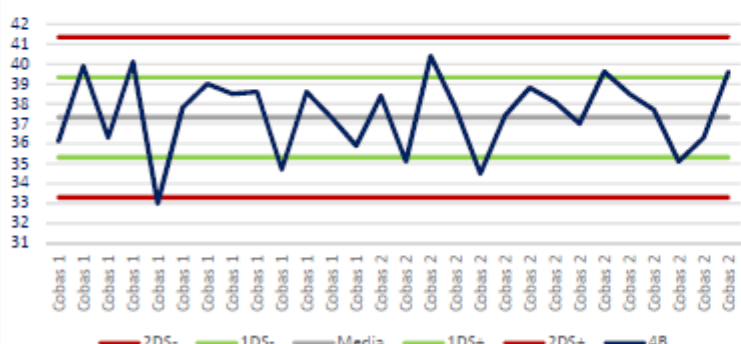
4A HPV 16 - 06/10/17-10/11/17



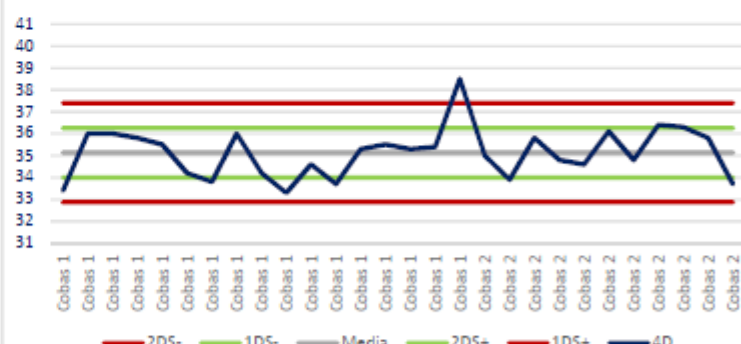
4C HPV 16 : 13/11/17- 27/12/17



4B HPV 16 - 06/10/17-10/11/17



4D HPV 16 : 13/11/17- 28/12/17



4A	HPV 16	BG
Media	36,29	34,84
DS	1,77	0,38
2DS+	39,83	35,60
2DS-	32,75	34,07
CV	4,80%	1,10%

4B	HPV 16	BG
Media	37,32	35,19
DS	2,01	0,39
2DS+	41,34	35,96
2DS-	33,30	34,40
CV	5,38%	1,10%

4C	HPV 16	BG
Media	35,69	34,84
DS	1,66	0,38
2DS+	40,70	35,60
2DS-	34,47	34,07
CV	4,38%	1,10%

4D	HPV 16	BG
Media	35,13	35,46
DS	1,13	0,33
2DS+	37,39	36,12
2DS-	32,87	34,80
CV	3,22%	0,93%

DATI DI ATTIVITÀ: FEBBRAIO - DICEMBRE 2016

Provenienza	Richieste	HPV test	Pap-test	Test Totali
Ravenna	7.078	7.047	840	7.887
Forlì	3.331	3.331	172	3.503
Cesena	3.891	3.891	409	4.300
Rimini	6.011	5.953	1145	7.098
AUSL Romagna	20.311	20.222	2.566	22.788

1° e 2° livello

DATI DI ATTIVITÀ: GENNAIO - DICEMBRE 2017

Provenienza	Richieste	HPV test	Pap-test	Test Totali
Ravenna	15.201	15.112	1.742	16.854
Forlì	7.377	7.364	589	7.953
Cesena	8.254	8.221	760	8.981
Rimini	10.155	9.911	1.560	11.471
AUSL Romagna	40.987	40.608	4.651	45.259

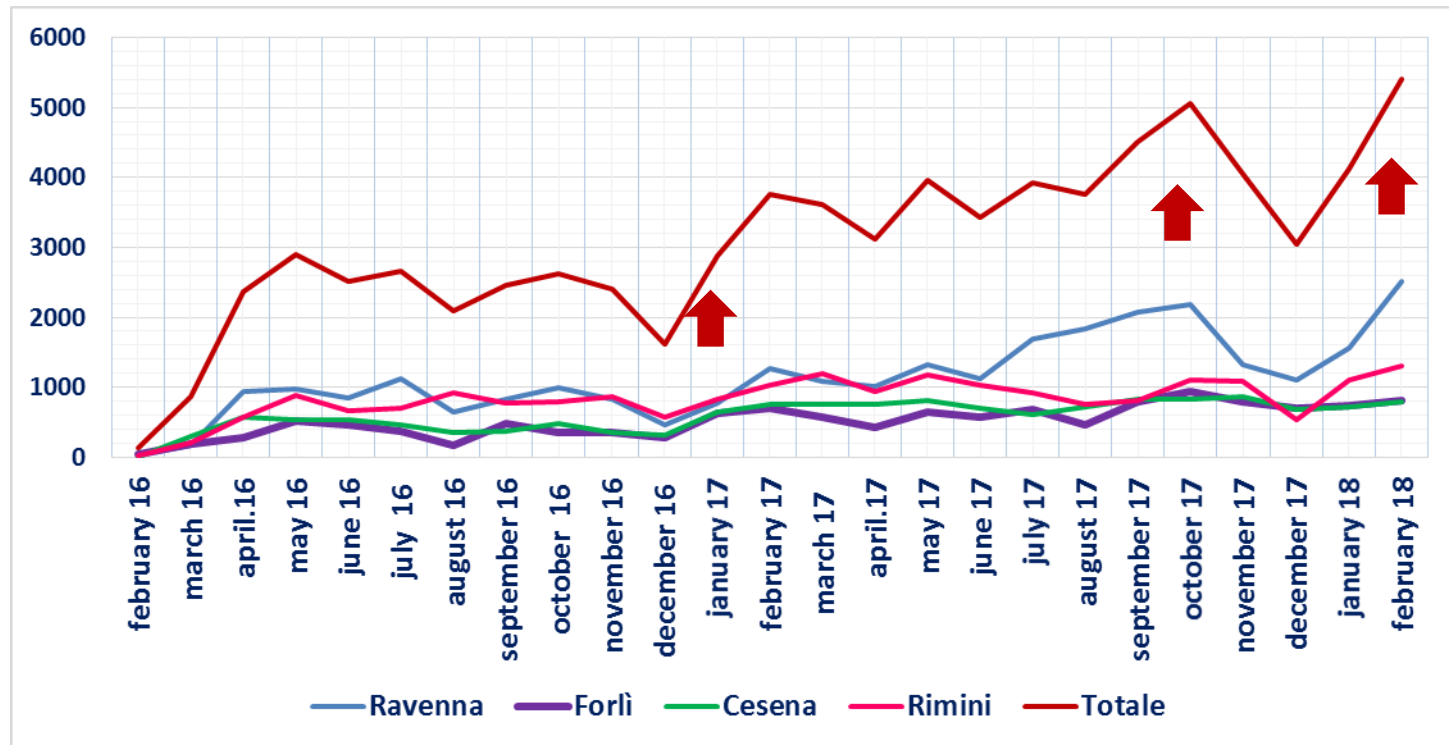
1° e 2° livello

DATI DI ATTIVITÀ: GENNAIO - FEBBRAIO 2018

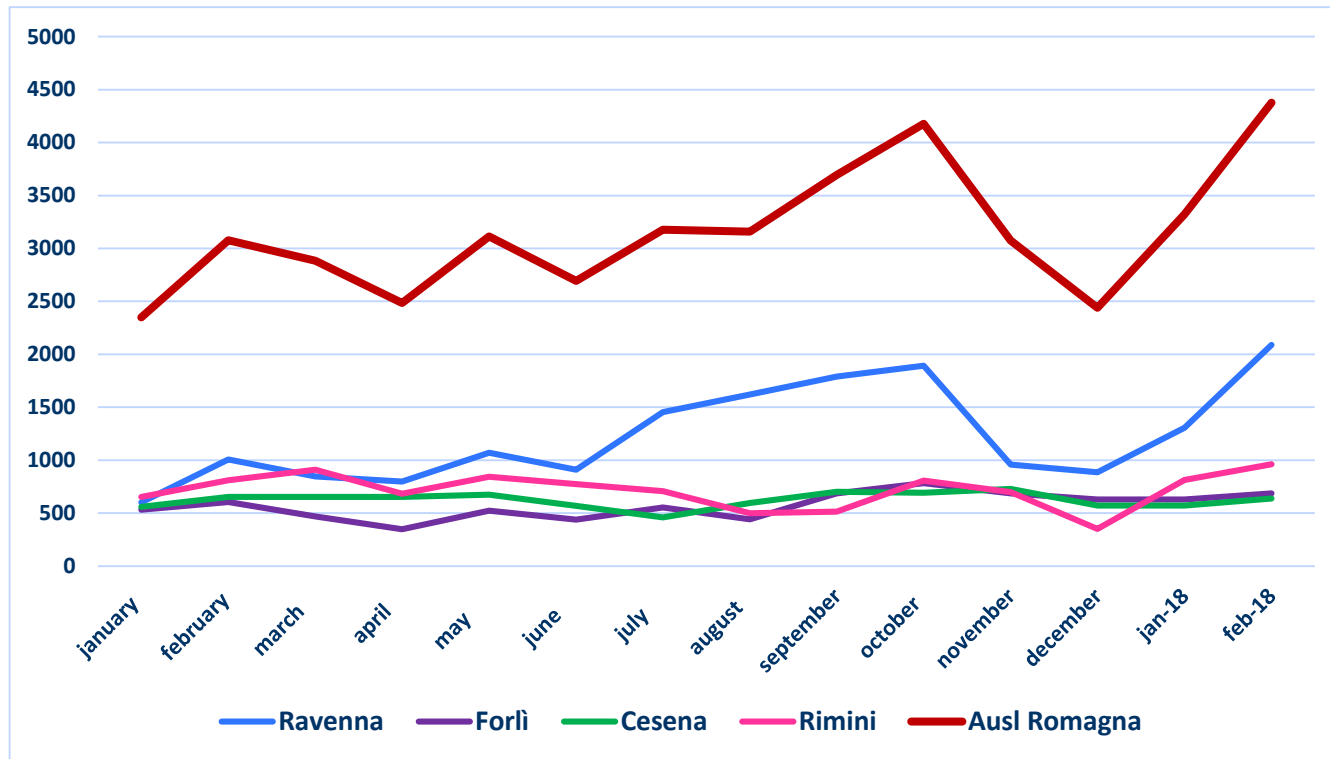
Provenienza	Richieste	HPV test	Pap-test	Test Totali
Ravenna	3.720	3.707	368	4.075
Forlì	1.412	1.402	142	1.544
Cesena	1.349	1.332	164	1.496
Rimini	2.137	2.102	298	2.400
AUSL Romagna	8.618	8.543	972	9.515

1° e 2° livello

DATI DI ATTIVITÀ: FEBBRAIO 2016 -FEBBRAIO 2018



HPV test: screening (H1) Gennaio 2017- Febbraio 2018



DATI DI ATTIVITA': SCREENING (H1)

Provenienza	2016			2017			Gennaio-Febbraio 2018		
	HPV test	Pap Test	% Positività	HPV test	Pap Test	% Positività	HPV test	Pap Test	% Positività
Ravenna	6.229	343	5,5	13.862	847	6,1	3.393	181	5,3
Forlì	2.322	134	5,7	6.705	432	6,4	1.319	96	7,2
Cesena	3.331	180	5,4	7.517	447	5,9	1.212	95	7,8
Rimini	4.572	238	5,2	8.272	541	6,4	1.774	109	6,1
AUSL Romagna	16.454	895	5,4	36.356	2.267	6,2	7.698	481	6,2

DATI DI ATTIVITA': percorsi H2/H3

Provenienza	2016			2017			Gennaio-Febbraio 2018		
	HPV test	Pap Test	% Positività	HPV test	Pap Test	% Positività	HPV test	Pap Test	% Positività
Ravenna	12	8	66,7	H2 180 H3 66	93 39	51,7 59,1	H2 73 H3 40	36 27	49,3 67,5
Forlì	5	4	80,0	170	97	57,0	42	29	69,0
Cesena	267	108	40,4	251	117	46,6	28	16	57,1
Rimini	45	16	35,5	488	222	45,5	130	66	50,8
AUSL Romagna	329	136	41,3	1.155	568	49,26	313	174	55,6

HPV test: percorsi C2, K1, K2

Provenienza	2016			2017			Gennaio-Febbraio 2018		
	HPV test	Positivi	%	HPV test	Positivi	%	HPV test	Positivi	%
Ravenna	806	351	43,5	991	464	46,8	192	77	40,1
Forlì	170	159	15,9	489	125	25,5	41	13	31,7
Cesena	293	125	42,3	453	222	49,0	85	42	49,4
Rimini	1.336	425	31,2	1.142	377	33,0	192	63	32,8
AUSL Romagna	2.605	1.060	40,7	3.075	1.188	38,6	510	195	38,2

NON IDONEI

Provenienza	Febbraio-Dicembre 2016		Gennaio-Dicembre 2017		Gennaio-Febbraio 2018	
	Non Idonei (Invalidi)	%	Non Idonei (Invalidi)	%	Non Idonei (Invalidi)	%
Ravenna	10	0,14	19	0,12	1	0,03
Forlì	1	0,07	14	0,19	1	0,07
Cesena	3	0,08	6	0,07	0	0,00
Rimini	21	0,35	18	0,18	4	0,19
AUSL Romagna	35	0,17	57	0,14	6	0,07

TEMPISTICA (gennaio-febbraio 2018)

		diff: PRELIEVO e SAMPLE SEEN	diff: SAMPLE SEEN e CHECK-IN	diff: CHECK-IN e VALIDAZIONE
Scr.uter.H1/2 HPV 5950	<i>Minimo</i>	0	4	0
	<i>Massimo</i>	13	7	3
	<i>Media</i>	3	1	0
Scr.uter.C2- K- Q1 HPV 5951	<i>Minimo</i>	0	4	0
	<i>Massimo</i>	16	5	3
	<i>Media</i>	4	1	0
HPV DNA qualitativo (cit.cerv)	<i>Minimo</i>	0	0	0
	<i>Massimo</i>	6	5	1
	<i>Media</i>	2	1	1

CRITICITA' e PUNTI DI FORZA

Sistema analitico:

- Livello automazione scarso (per gli standard 2018):
 - HoT circa 5 ore per 2 sedute (escluso preparazione PAP)
 - Personale richiesto (1.5 TSLB/g)
- Affidabilità strumentazione (Preanalitica)
- Complessità Integrazione SW
- Spazi necessari

Integrazione fra citologi e virologi (ognuno fa quello che sa fare meglio.....)

Contatto diretto e giornaliero fra gli attori (da CS a Microbiologia) del percorso

VEQ e CQI condivisi (anche oltre RER)

Tavolo Tecnico RER

Costi (senza tenere conto del personale.....)