

GISCI

Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma

**il futuro dello screening
lo screening del futuro**

ferrara, 10-11-12 giugno 2009

Test HPV: controlli di qualità e marcatori molecolari

Francesca Carozzi
ISPO- Firenze

HPV test nello screening

- Metodi diagnostici accurati con la massima specificità e sensibilità clinica
- I risultati del test HPV (e della tipizzazione) devono essere solidi, affidabili , riproducibili e confrontabili
- Tecnologia, per adesso confinata in ambiti ristretti e controllati
- Indispensabile lo Sviluppo di un programma di assicurazione di qualità per il test HPV per monitorare e confermare l'accuratezza dei risultati , stabilire criteri di valutazione dei risultati rispondenti a requisiti di qualità clinicamente adeguati

HPV e screening cervicale

- Triage ASC-US/LSIL
 - Follow-up di donne trattate per CIN2/3
 - Test di screening primario
-
- ✓ 13 tipi di HPV ad alto e medio rischio
16,18,31,33,35,39,45,51,56,58,59 e 66
 - ✓ testare il gruppo di HPV ad alto rischio può essere sufficiente nel contesto di protocolli clinici e di screening (Bosch 2003)

..e il typing?

- **Il ruolo del laboratorio nei programmi di vaccinazione anti HPV :**
 - Studi epidemiologici sulla distribuzione dei tipi
 - Monitorare l'efficacia dei vaccini
- **Management di donne Hr-positive nei programmi di screening:**
 - Tipizzazione tipo-specifica nelle infezioni persistenti (definizione di infezione persistente)
 - nel follow-up delle lesioni trattate
 - Differenziazione del rischio per CIN3+ in base al tipo presente

Controlli di qualità esterni ed interni

- La partecipazione a programmi di Verifica Esterna di Qualità è contemplata sia come requisito minimo per l'esercizio delle attività sanitarie, che per l'accreditamento del laboratorio (*Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, suppl.ord. n.113, 15 dicembre 1993, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, suppl.ord. n.42, 20 febbraio 1997*)
- I programmi di VEQ rappresentano un indispensabile complemento dei programmi di CQI, perchè forniscono una valutazione comparativa della qualità analitica del singolo rispetto a quella del gruppo dei laboratori partecipanti
- E' importante che il laboratorista realizzi che, di per sè, nessun programma di QC può migliorare la qualità analitica di un metodo.
- Tuttavia, un avveduto utilizzo dei risultati di VEQ può condurre ad una selezione di metodi che portino alla uniformazione dei risultati ottenuti da un gruppo di laboratori differenti.

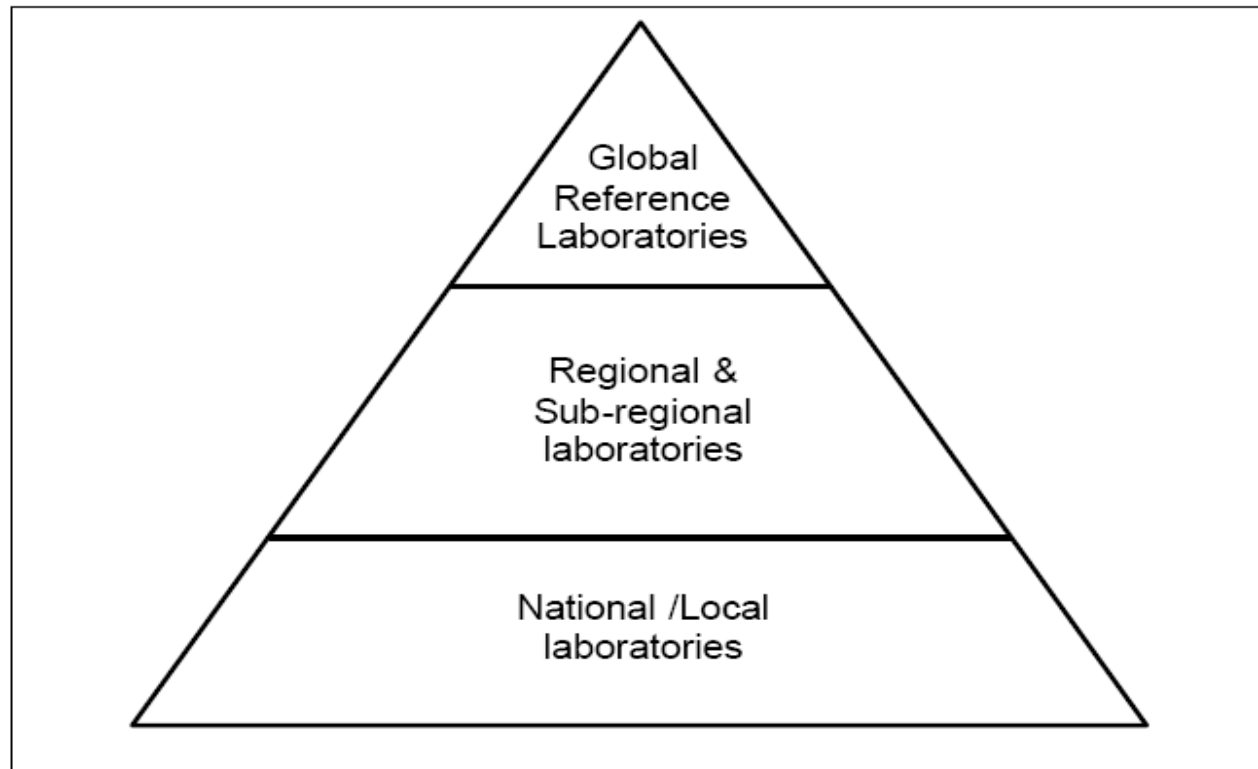
WHO HPV LAB NET

Mission Statement

- Support the introduction of HPV vaccines and surveillance of disease and infection.
- Support for clinical diagnosis or screening could run concurrently with this effort but should not be the major focus of the network at this stage.

WHO HPV LAB net Network structure

Figure 1: Network structure



Laboratories are expected to assume national, regional and/or international responsibilities, and to be instrumental in developing and supporting HPV laboratory work in their respective geographical areas.

Summary of international efforts on HPV testing and typing quality (WHO HPV LabNet)

- **International standards:**
 - International standards for amount of HPV16DNA and HPV18 DNA (IU) established. IS for other types being developed.
- **Proficiency panel for HPV DNA testing and typing** – International availability.(www.who.int)
- **The WHO HPV Laboratory Manual** (Guidelines on Standards and Quality Indicators, examples of SOPs found to work)

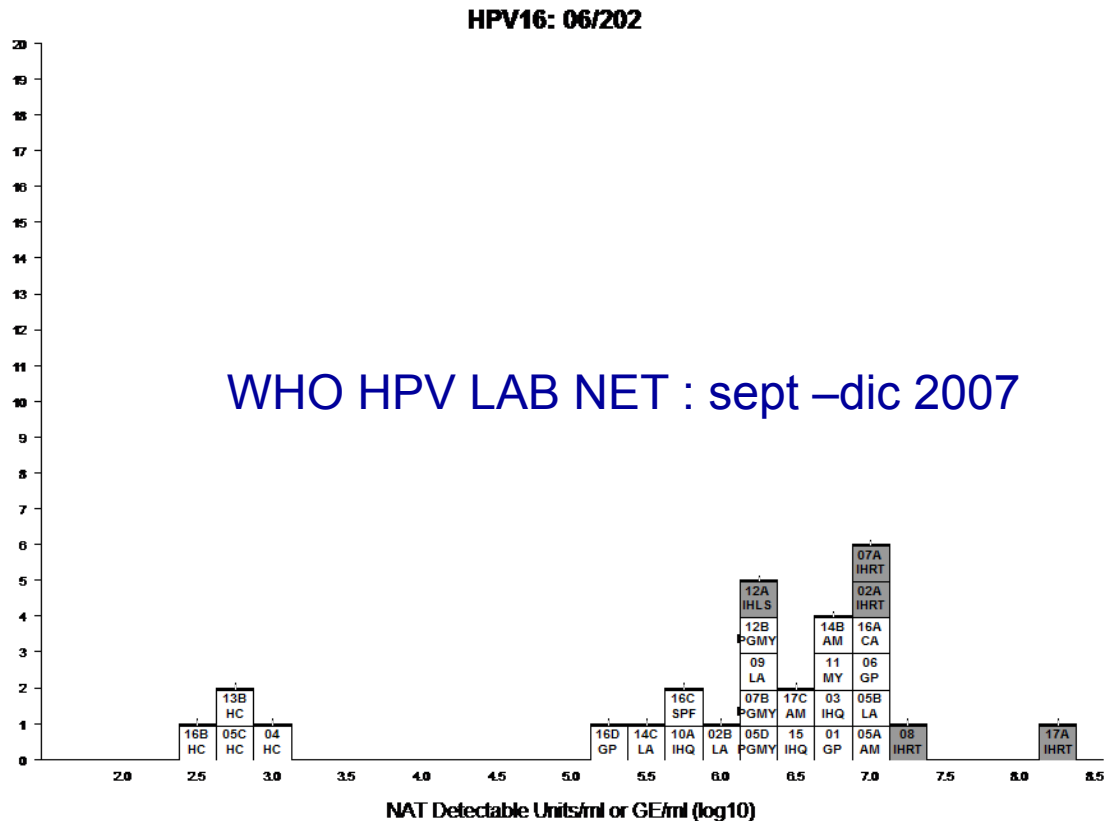
Sviluppo international standards per HPV 16 and 18

- Il DNA di HPV 16 e 18 è stato clonato nel vettore pBR322.
- I plasmidi pHPV16 and pHPV18 forniti da Wheeler.
- **Formulazione del DNA di HPV**
 - ❑ 1×10^7 genomi/ml di HPV 16 o HPV 18
 - ❑ DNA della linea cellulare umana di C33a ad una concentrazione finale di 1×10^6 genomi/ml
 - ❑ 10mM Tris buffer pH7.4
contenente 1mM EDTA e 5 mg/ml trehalose
- **Liofilizzati in provette da 0.5ml**
- Dei 18 laboratori invitati a partecipare allo studio, 13 hanno accettato l'invito.
- 1 settembre 2007- Termine di adesione allo studio.
Ottobre 2007-
Novembre 2007- report per WHO per le considerazioni su ECBS.
- **Diluente per le diluizioni seriali**
 - ❑ DNA della linea cellulare umana C33a ad una concentrazione finale di 1×10^6 genomes/ml dH₂O.
 - Fornisce un background di DNA cellulare

Paper submitted

WHO Collaborative Study to Establish WHO International Standards for Human Papillomavirus (HPV) Type 16 DNA and HPV Type 18 DNA Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays

Nineteen laboratories from 13 countries participated in the study using a wide range of commercial and in-house quantitative and qualitative assays



WHO HPV LAB NET

A quality indicator based on proficiency panels

- Sensitivity and specificity should be evaluated at least annually using a blinded proficiency panel
- Results should at least conform to what is considered useful for the intended purpose (HPV surveillance)
- Proficiency (suggested):
 - Mis-typing and false positive: none allowed
 - Sensitivity: 50UI for HPV 16 and HPV 18, 500 genome equivalents for other HPV types

Consideration for composition of WHO HPV DNA proficiency panel

- HPV types: 14 oncogenic and 2 benign HPV types (most likely everything that will be of interest for HPV vaccination for the foreseeable future)
- Sensitivity requirement: high requirement for HPV 16 and HPV 18, less important for other types
- Should be able to detect multiple infections
- High capacity to detect wrong typing (cross-hybridisation etc..), related types systematically separated into different pools
- Should work for all HPV DNA detection system known today
- Expand the proficiency panel also to include serial dilutions of single HPV types for all 16 HPV types in the panel
- Include a DNA extraction control

STUDY completed 7/11/2008. 79 different data set delivered from 48 laboratories



2nd Panel composition

HPV type	Copy number/5 ul
16	500, 50, 5
18	500, 50, 5
6	500, 50
11	500, 50
31	500, 50
33	500, 50
35	500, 50
39	500, 50
45	500, 50
51	500, 50
52	500, 50
56	500, 50
58	500, 50
59	500, 50
66	500, 50
68	500, 50
11,18,31,51	500, 50
16,33,45,52	500, 50
35,39,59,66	500, 50
6,56,58,68	500, 50
None	-
Cells with HPV16	800
Cells without HPV	-

aThe HPV 11 and HPV 58 have been re-engineered so that the vector (pGEM4z) is positioned in the L2 (position 4781) and the E1 (position 1158) gene, respectively.

bFor HPV 35 two clones have to be included: HPV35-S contains the entire genes from L1 through E7 including nucleotides 5012-956, and HPV35-L including nucleotides 956-5012.

HPV39 not re-engineered (yet) to contain an intact L1 ORF. HPV39 should be considered as "Not included" for PGMY-based assays.

**WHO HPV Laboratory Network (LabNet)
HPV DNA Proficiency Study**



Dr Francesca Maria Carozzi
CSPO-Scientific Institute of Tuscany Region
Operative Unit: Analytical and biomolecular cytology
Villa delle Rose, via Cosimo il Vecchio 2
50139 Firenze, Italy

We appreciate your participation in the WHO HPV LabNet Proficiency Study.

Herewith, we enclose the results of your laboratory in the testing of WHO LabNet HPV DNA proficiency panel.

A test is regarded as proficient in typing if it can detect 50 International Units / 5 μ l of HPV 16 and HPV 18 DNA, and 500 genome equivalents / 5 μ l of the other HPV types included in the panel.

In addition, the specificity of the reported types should be ≥ 97 % (i.e. at most 1 false positive result).

Accordingly, your dataset is proficient for detection of HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 66 and 68.

Reproducibility of HPV DNA Testing by Hybrid Capture 2 in a Screening Setting

Intralaboratory and Interlaboratory Quality Control in Seven Laboratories Participating in the Same Clinical Trial

Francesca Maria Carozzi, PhD,¹ Annarosa Del Mistro, MD,² Massimo Confortini, PhD,¹ Cristina Sani, MD,¹ Donella Puliti, MD,¹ Rossana Trevisan,² Laura De Marco, PhD,³ Anna Gillio Tos, PhD,³ Salvatore Girlando, MD,⁴ Paolo Dalla Palma, PhD,⁴ Antonella Pellegrini, PhD,⁵ Maria Luisa Schiboni, PhD,⁵ Paola Crucitti, MD,⁶ Paola Pierotti, MD,⁶ Alberta Vignato, MD,⁷ and Guglielmo Ronco, PhD⁸

Frame of the project

Ministry of Health Promoted studies on HPV type specific prevalence in:

- women 25-64 (PI Ronco Turin, PI Giorgi Rossi Rome)
- in women 18-24 (PI Ronco-Salmaso ISS)
- typing 1000 CIN2+ lesions on tissue samples in the past 10 years (PI Giorgi Rossi)
- pilot vaccine study in 1000 women 18-24 (PI Salmaso)



- **HPV screening test (HR-HC2):**

- 11 Labs**

- 3 lab use samples collected in PreservCyt Solution
- 8 lab use samples collected in STM Digene

Test di Screening EQA HPV (HR-HC2)

METODI

1. Proficiency study

5 campioni sintetici in cieco con una concentrazione nota di DNA di HPV 16 purificato (range da 0 a 5 pg/ml, secondo il limite di detection del test) e con valore atteso all'HC2 (RLU/CO)

2. Studi di riproducibilità

54 campioni clinici anonimi conservati in STM e in Presercyt solution inviati due volte all'anno

Tutti i campioni devono essere compresi nelle analisi di routine e testati due volte. I risultati di RLU/CO sono inviati da ogni laboratorio ad un Laboratorio A

- I valori sono stati considerati negativi quando (<1.00 pg/ml), low positive (1.00 a 10.00 pg/ml) e high positive (>11.00 pg/ml)
- Analisi di concordanza con statistica Kappa (K) totale e per le singole categorie .

HPV Screening Test Reproducibility Kappa value for multiple raters Preliminary results for 8 Labs

0.894 Kappa value qualitative pos/neg

	Clinical samples (54)
	0.89
	0.75
	0.91
Overall	0.86

Table 4
Interlaboratory Quality Control*

Hybrid Capture 2 Result	ThinPrep Samples	STM Samples
Negative	0.91	0.93
Low-positive	0.60	0.87
High-positive	0.69	0.90
Overall	0.74	0.90

PC, positive control specimen; RLU, relative light units.

* κ values for multiple raters. Data were categorized as negative (<1 RLU/PC), low-positive (1 to <11 RLU/PC), and high-positive (≥ 11 RLU/PC [see the text]). For proprietary information, see the text.

Conclusioni (1)

- L'HC2 conferma una buona accuratezza
- i Metodi EQA dovrebbero essere applicati a tutti i sistemi di rilevazione del DNA di HPV, in particolare ai nuovi test di screening dell'HPV da poco disponibili
- nel protocollo EQA è necessario monitorare l'intero processo, inclusi i metodi di estrazione (è importante notare che diversi nuovi metodi di screening dei HR-HPV includono l'estrazione del DNA)
- La disponibilità degli Standards Internazionali del WHO per l'analisi del DNA dei più importanti tipi di HPV semplificherà la valutazione della sensibilità dei diversi metodi da parte dei laboratori e inoltre sarà più semplice calibrare altri standards per i proficiency studies

Test HPV : Il ruolo del Gisci

- Promuovere iniziative che permettano di creare una rete funzionale di laboratori HPV:
 - **Formazione (per strutture che devono acquisire competenze molecolari della specifica problematica)**
 - **Linee-guida specifiche :**
 - **Quale o quali metodologie:** 'applicazione di procedure validate e standardizzate
 - **Quale cut-off**
 - **Quale refertazione**
 - **Promuovere iniziative per la partecipazione a programmi** per la verifica della qualità e proficiency testing

CQI

- In tutti i laboratori devono essere attivi controlli intra-laboratorio (**CQI**, almeno un' esecuzione per ogni sessione analitica) archiviati giornalmente nelle apposite sezioni dei programmi informatici di gestione degli strumenti
- Nel caso di valutazioni semiquantitative si dovrebbe sempre eseguire almeno un controllo su un livello di concentrazione.
- Per i parametri qualitativi si utilizzano due livelli di campione di controllo (positivo e negativo) con valori vicino al valore soglia (cut-off)

VEQ

organizzazione complessa e costi

- aspetti organizzativi quali la preparazione dei campioni da testare nei mezzi di trasporto, il recapito periodico dei Campioni ai partecipanti, la raccolta delle risposte, la trasmissione delle risposte per la relativa elaborazione statistica ed infine il recapito dei Rapporti ai partecipanti.

Gisci

Il Gruppo di lavoro “Test di primo livello”

- Sottoprogetto : Studio di concordanza inter-laboratorio e VEQ per test HPV-DNA
 - Valutare la fattibilità e favorire la partecipazione ad uno studio di riproducibilità
 - Analisi problematiche specifiche
 - Frequenza e numero di campioni
 - Modalità di analisi statistica e presentazione, grafica e/o numerica, dei risultati di tale analisi.
 - Selezione dei limiti di accettabilità
- Le adesioni vanno inviate alla Segreteria GISCi, Mrs. Sandrine Kom, segreteria@gisci.it, per l'inoltro ai rispettivi referenti

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

Requirements of HPV tests in primary cervical screening

In a primary cervical screening setting a HPV detection assay should fulfill the following requirements:

1. The candidate test should have a clinical sensitivity for \geq CIN2 not less than 90% of the clinical sensitivity of the hc2 in women of at least 30 years. This recommendation is based on recent meta-analyses that reported a pooled sensitivity for hc2 of 97.9% (95%CI: 95.9%–99.9%) in primary screening in Europe and North-America⁶ and a pooled sensitivity of 97.9% (95%CI: 95.9%–99.9%) in primary screening in Europe and North-America⁷.
2. The specificity of the candidate test for \geq CIN 2 should be at least 98% of the specificity of hc2. This should be determined by applying the noninferiority test to a random sample of women of at least 30 years of age from a population-based screening cohort, tested by hc2, either or not combined with cytology, and the candidate test and that did not have histologically confirmed \geq CIN 2. To achieve a power of 80%

***Risultati della tipizzazione di 2921 donne positive
all'HC2 (RLU \geq 1)
al reclutamento per lo studio NTCC***

Positive for HC2-targeted types by reverse line blotting after PCR with GP5+/GP6+ primers	2208	75.6%
Positive for HC2-targeted types by reverse line blotting after nested PCR	38	1.3%
Positive for HC2-targeted types by sequencing	23	0.8%
Only high risk HPV types not detected by HC2	272	9.3%
Only low risk or unidentified HPV types	91	3.1%
No HPV infection detected	289	9.9%
Total	2921	100%

Carozzi et al Malmo 2009
data from NTCC trial

Efficienza del laboratorio



▶ Fino a 352 risultati del test hc2 in 6.5 ore

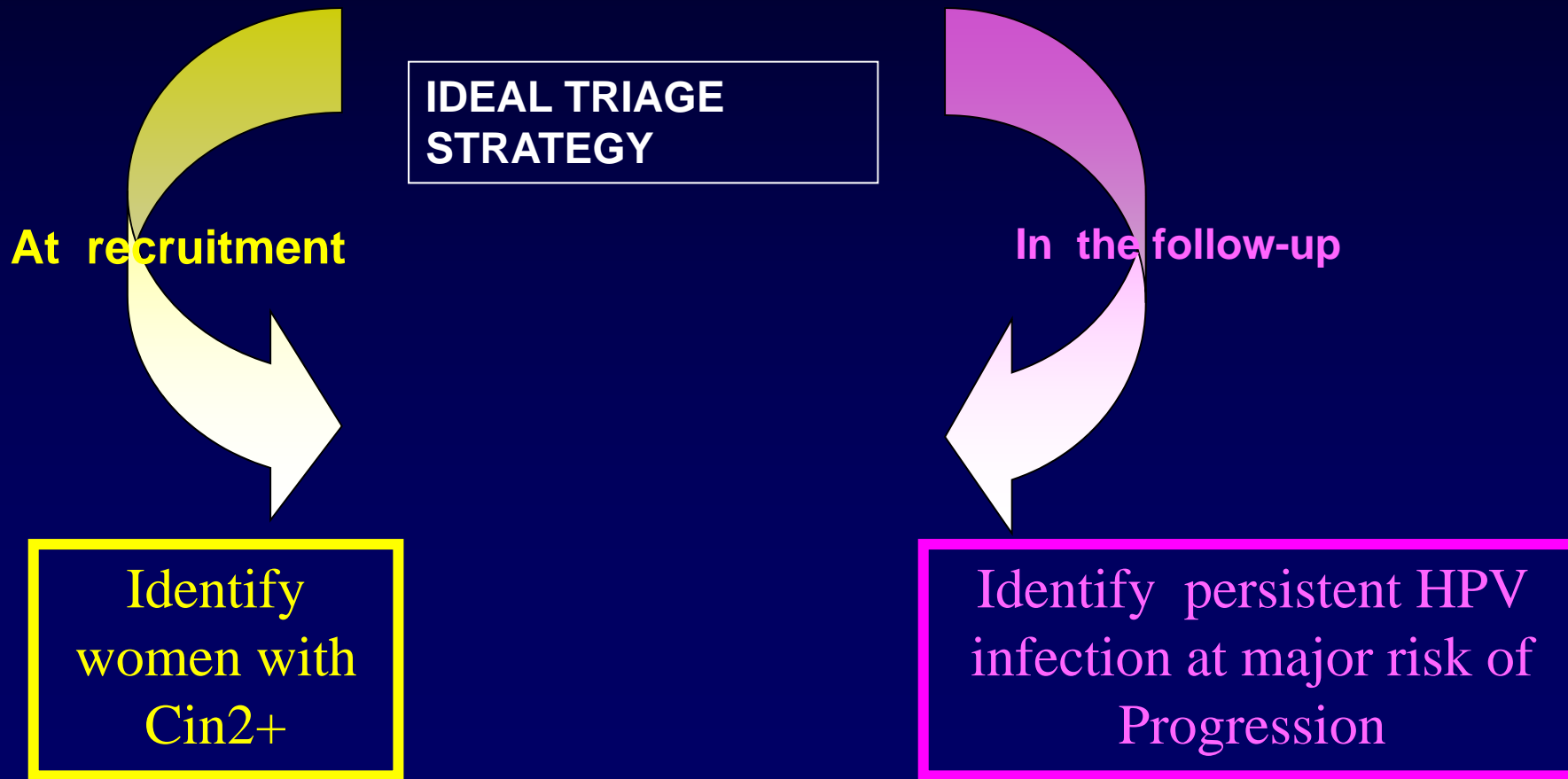
▶ 3.5 hours of continuous hands-free time

- **Test HPV centralizzati in laboratori individuati per l'esperienza acquisita, per le loro caratteristiche strutturali/gestionali**
- **Laboratori HPV :Indispensabile stretta integrazione con le varie fasi del programma di screening**

HPV testing is more sensitive but less specific than cytology.



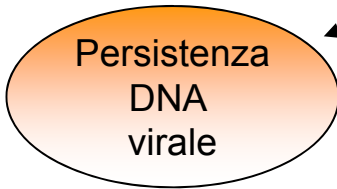
Methods for triaging HPV positive women are warranted



Fattori di rischio virali
-HPV tipo
-Carica virale
-varianti

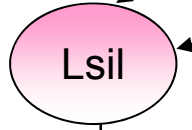
Diminuito controllo immunitario

Mutageni

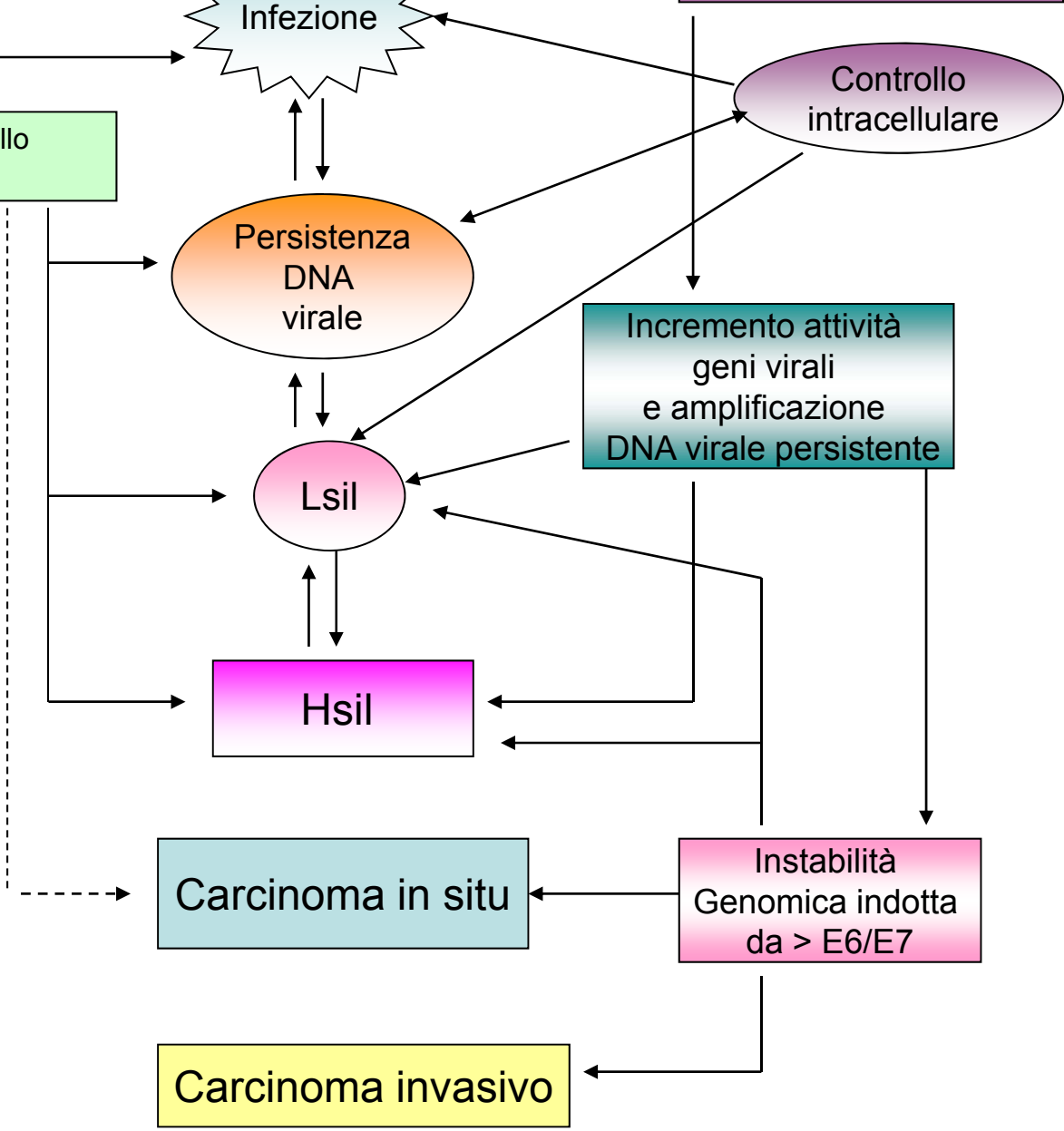
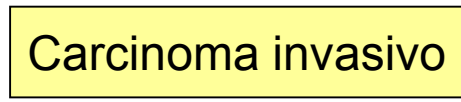
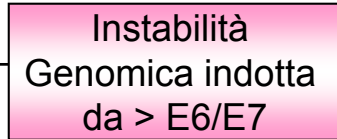
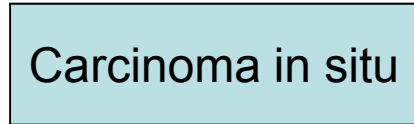


Incremento attività geni virali e amplificazione DNA virale persistente

E6/E7 iperespressione : la progressione è accompagnata dalla disregolazione delle proteine virali ad attività trasformante : Instabilità cromosomica, aneuploidia, aumento delle modificazioni nel DNA della cellula ospite



FATTORI DI RISCHIO NON LEGATI AL VIRUS:
-N° di partners
-mutageni
- Fumo
-Coinfezioni (Clamidia, - Herpes..)
-Sistema immunitario
-Predisposizione genetica



HPV typing in primary screening

- Three prospective studies have assessed the risk CIN2+ risk after comprehensive HPV typing in primary screening (Schiffman et al, 2005; Berkhof et al, 2006; Naucler et al, 2007) and several prospective studies have assessed certain clusters of HPV types (Koutsky et al, 1992; Liaw et al, 1999; Sherman et al, 2003; Szoke et al, 2003; Peto et al, 2004; Winer et al, 2005; Khan et al, 2005).
- Remarkably consistent findings that HPV16 has much higher risks than other so-called "high risk" types.

HPV types and risk

- Both randomised primary and secondary screening trials point to HPV16/18/31/33 (in particular HPV16) as having strongly increased risk for CIN2+, compared to other so-called “high-risk” types.
- HPV testing that includes HPV typing will strongly affect predictive values for subjects testing positive.
- Type-specific persistence important determinant of risk in primary screening and in post-treatment follow-up (in contrast to type changes)
- Further work is required to investigate how this information could be used in screening or in ASCUS / CIN 1 triaging strategies.

Can HPV Viral load be used for better detection of CIN2/3+?

No

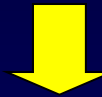
Both cross sectional and longitudinal studies show that viral load has no additive value to stratify hrHPV positive women for risk $>$ or $=$ CIN2+ or CIN3+

Study population

The NTCC study is a multicentre Italian randomized controlled trial evaluating the HPV test as primary screening tool for cervical cancer screening.

The study involved approximately 100,000 women aged 25 to 60 years, screened in 9 organized programs. Women were randomized in two arms over two phases (Phase I and Phase II). Women were tested for HR-HPV by Hybrid Capture 2 (HC2).

Sensitivity and specificity of different triage strategies for the presence of CIN2 or more severe histology computed among HC2 positive women



Management of HC2 positive women different by age and by 2 phases

- **Phase 1**

- **Age 35-60:** all referred to colposcopy independently by cytology result

- **Triage data for cytology and typing available**

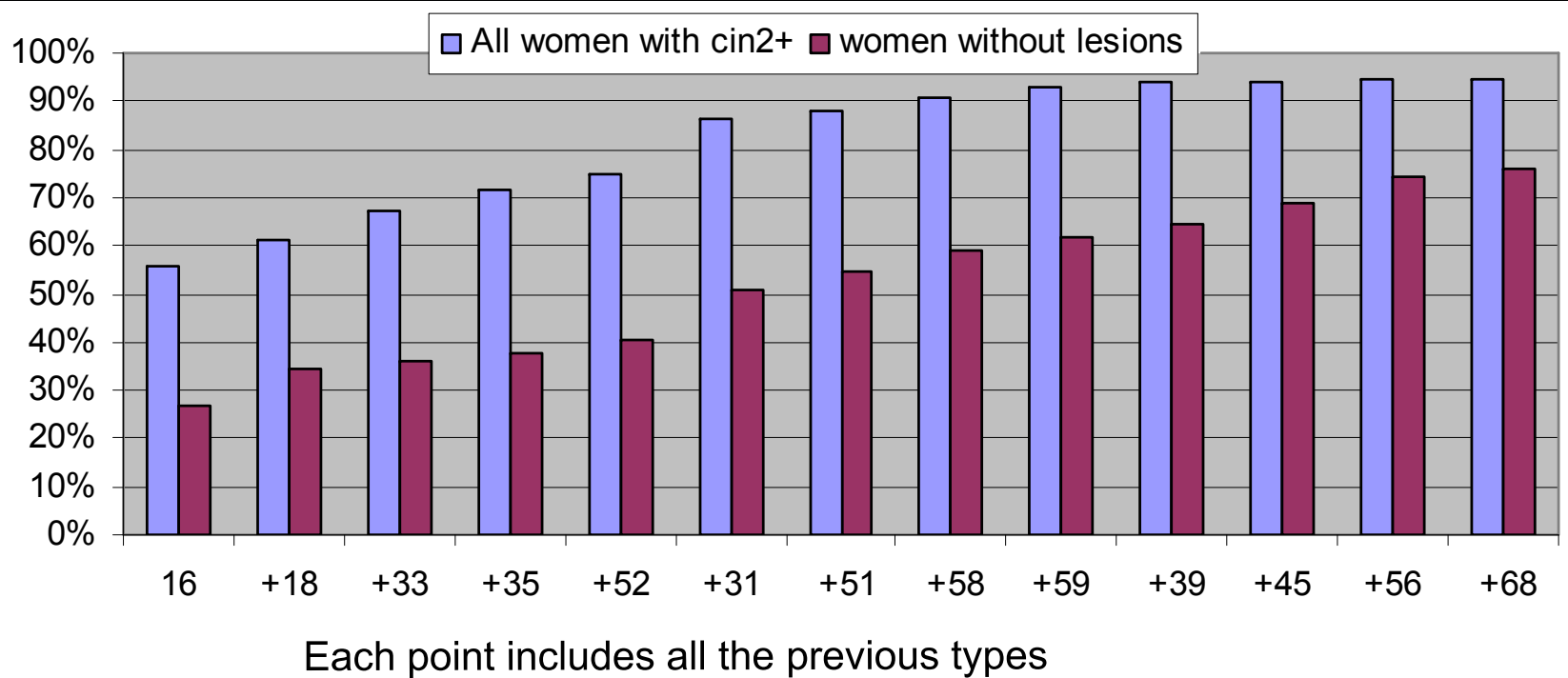
- Age 25-34: referred if cytology ASCUS+ (immediately) or if HC2 still positive after 1 year

- **Phase 2**

- **All women 25-60** referred to directly to colposcopy independent of age

- **Triage data for p16 and typing available**

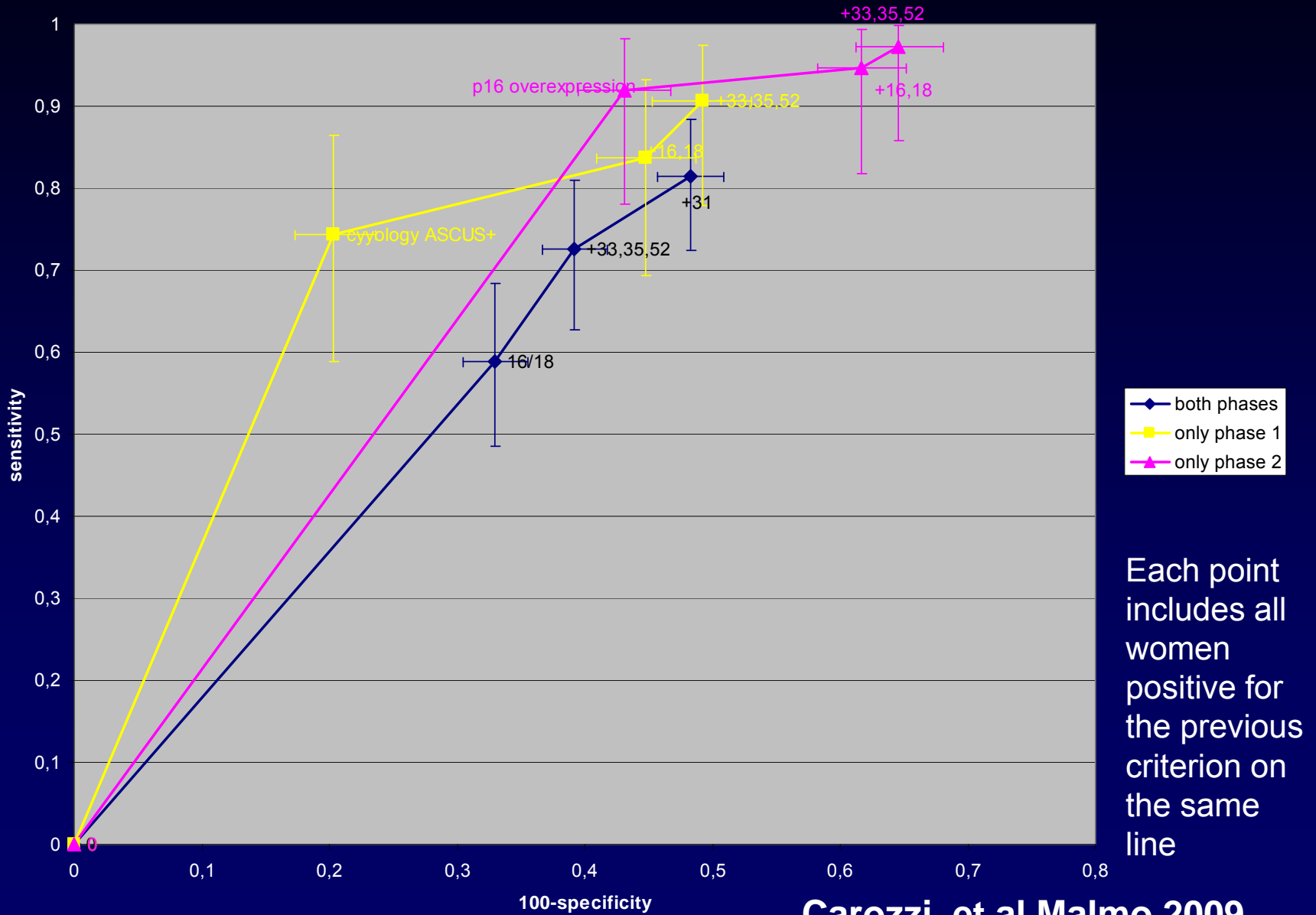
NTCC STUDY: preliminary genotyping at recruitment



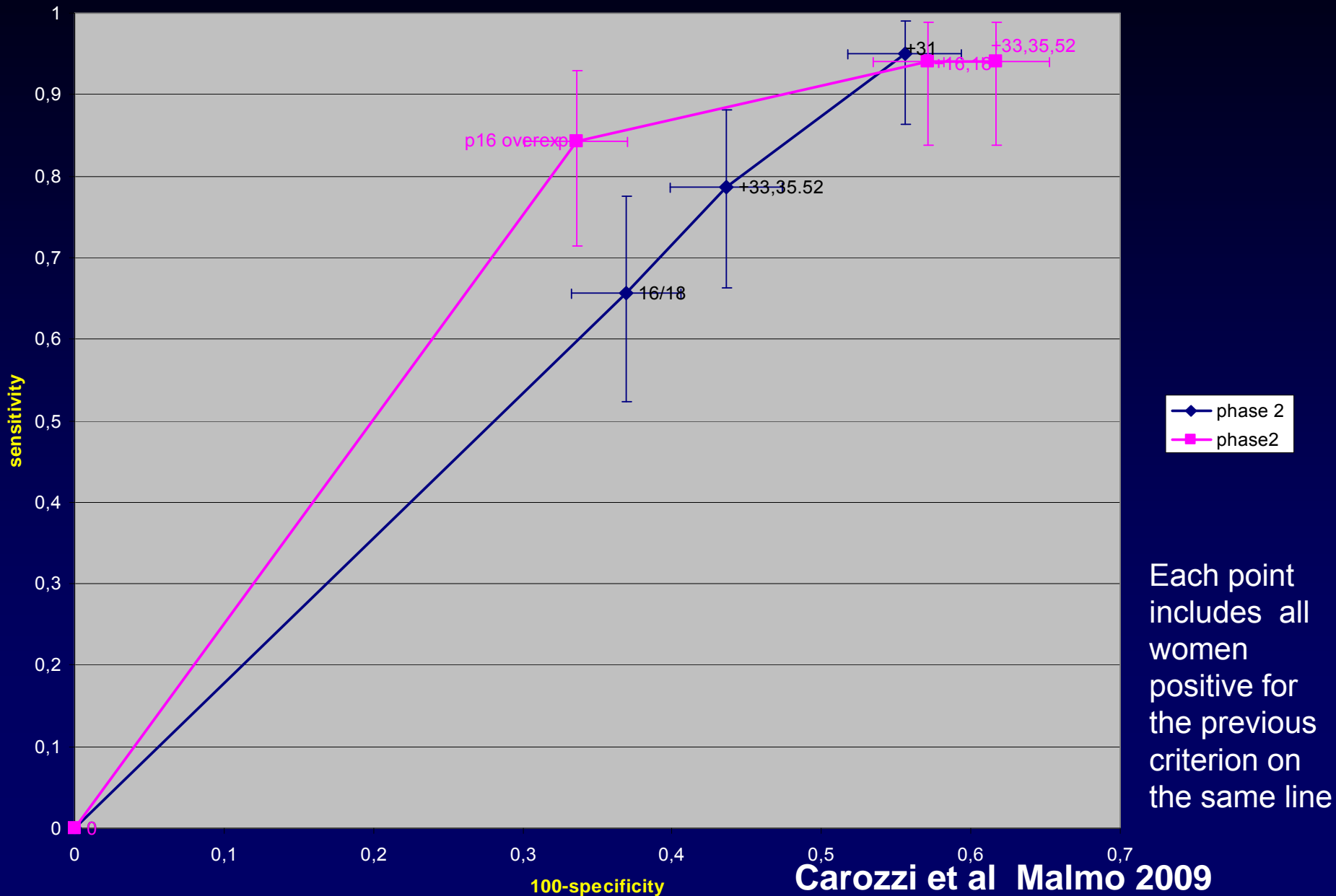
Carozzi et al Malmo 2009

NTCC STUDY – women age 35-60

ROC curves for different triage strategies among HC2 positive women Endpoint: presence of CIN2 or more severe histology

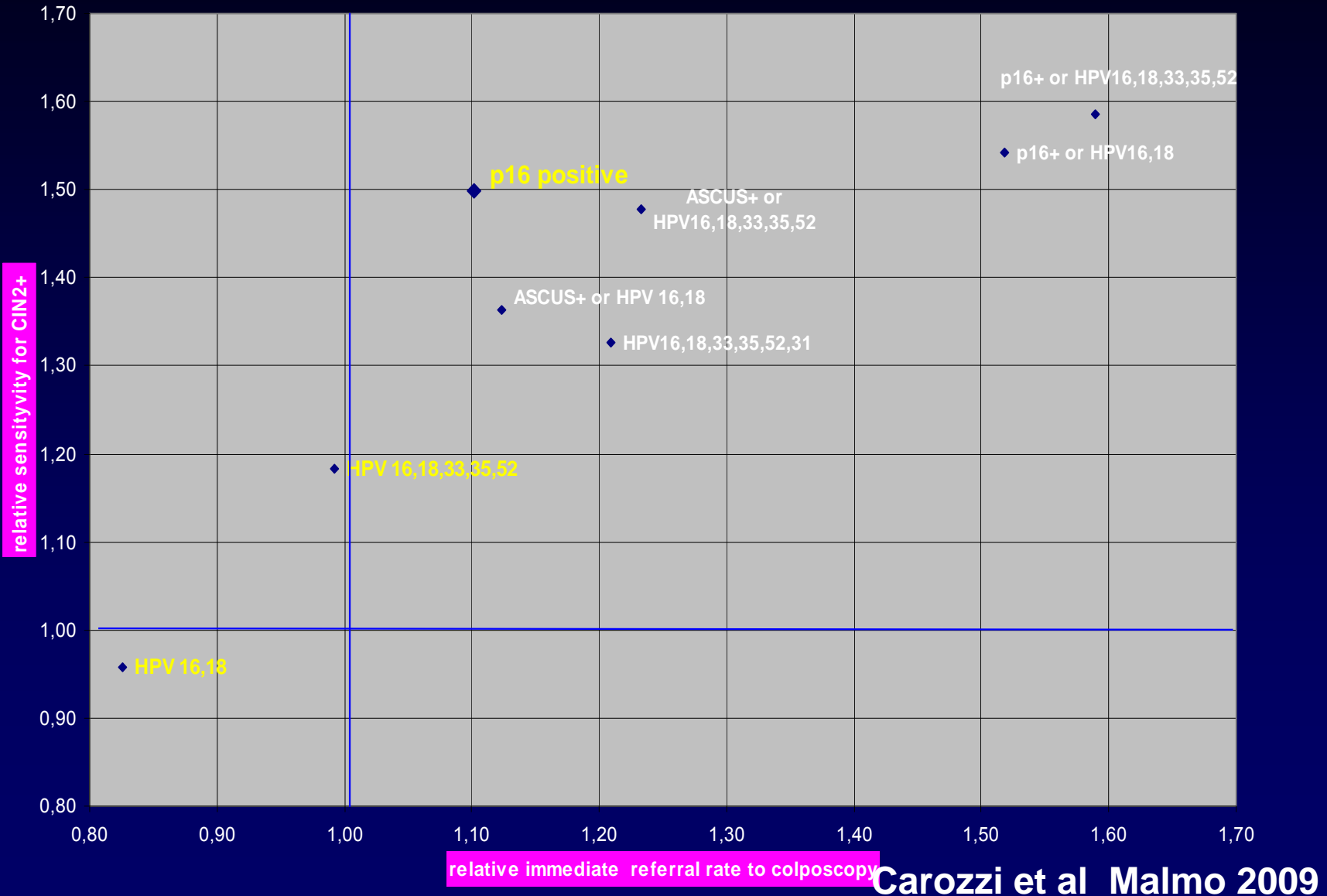


NTCC STUDY – women age 25-34
 ROC curves for different triage strategies among HC2 positive women
 Endpoint: presence of CIN2 or more severe histology



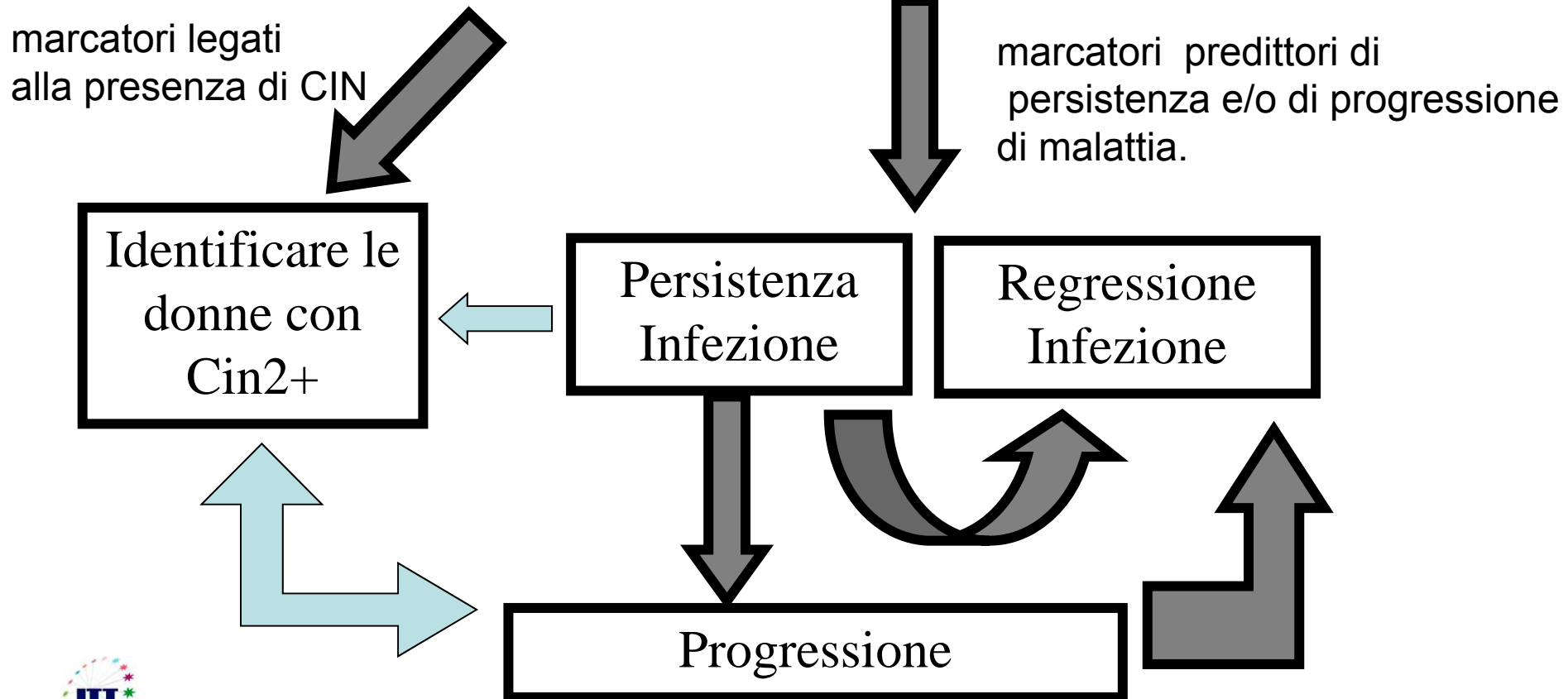
NTCC STUDY – women age 35-60

Relative (vs. conventional cytology) sensitivity for the presence of CIN2+ and immediate referral rate to colposcopy of HPV testing followed by different triage strategies



Cosa chiediamo ad un marcatore molecolare?

Definire la miglior strategia di follow-up in pazienti HPV positive in grado di migliorare la specificità del test
Individuare pazienti con infezione e lesioni preneoplastiche a maggior rischio di progressione

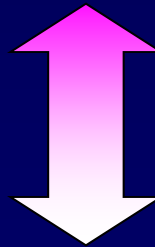


Processo di validazione di un biomarcatore

Prima che un biomarcatore possa essere inserito nei protocolli di screening occorre:

- 1) dimostrare la sua performance clinica in un campione rappresentativo della popolazione verso un ben preciso e rigoroso endpoint (\geq CIn3)
- 2) CIN2 sono diagnosi 'equivocche' per lesioni precancerose: i test molecolari utilizzati nello screening devono essere accurati per vere lesioni precancerose e alcune cin2 risulteranno negative perché non sono 'vere' lesioni precancerose
- 3) test automatizzabili e con risultati facilmente interpretabili
- 4) un modello di rischio per il management clinico

I nuovi marcatori devono essere misurati in maniera rigorosa:



Banche biologiche



HPV QA Working Group

Abruzzo: Angeloni C, Lattanzi A, Maccallini V, Caraceni D, Fortunato C. , L. Ciccocioppo ; **Sardegna, Cagliari :** Macis R, **Campania:** Cavillo G, Di Iasi A, Santarsiere A, Casto L, Manno M, Santangelo C, Pini MT, Gallicchio G, Scherillo I, Barretta E, De Santis V, Ercole F. **Sicilia Catania:** Scalisi A. **Lazio:** Giorgi Rossi P, Chini F, Capparucci P, Marsili L, Tufi MC, Gomez V, Verrico G, Schiboni ML, Pellegrini A, Bove E, D'Addetta A, Placidi A. **Toscana:** Confortini M, Bisanzi S, Sani C. G.Venturini **Torino:** A. Gillio Tos, L. De Marco, G. Ronco **Trento:** S. Girlando P. Dalla Palma; **Veneto:** AnnaRosa Del Mistro, *H. Frayle* ; **Emilia-Romagna:** *P. Pierotti*