

La gestione dell'autoprelievo in laboratorio dalla fase pre-analitica alla analitica

Laura De Marco

*Centro Unificato Screening Cervico Vaginale
AOU Città della Salute e della Scienza - Torino*

*Gruppo di lavoro 1^a livello Autoprelievo: S. Bulletti, F. Carozzi, C. Cocuzza, A. Chiereghin, L. De Marco,
A. Del Mistro, S. Gori, D. Gustinucci, V. Nofrini, B. Passamonti, C. Sani*

Il sottoscritto Laura De Marco

ai sensi dell'art. 3.3 sul Conflitto di Interessi, pag. 17 del Reg. Applicativo dell'Accordo Stato-Regione del 5 novembre 2009,

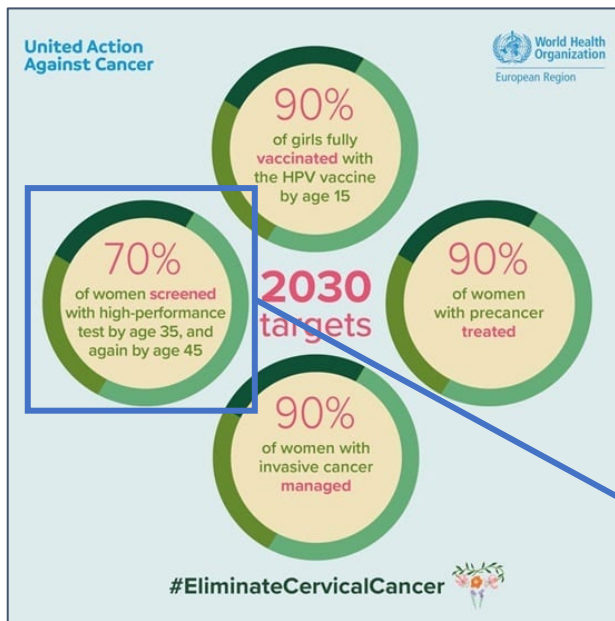
dichiara

che negli ultimi due anni NON ha avuto rapporti diretti di finanziamento con soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario

che negli ultimi due anni ha avuto rapporti diretti di finanziamento con i seguenti soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario:

- Becton Dickinson

PERCHE' PARLARE DI AUTOPRELIEVO....



2.18. Che cos'è il self sampling?

♦ Il *self sampling*, in italiano "autoprelievo", consente il prelievo di cellule per il test HPV al proprio domicilio e l'invio al laboratorio, generalmente per posta. Questa modalità di prelievo è utilizzata a volte per aumentare la partecipazione al programma di screening delle donne che hanno difficoltà a recarsi agli ambulatori. Il *self sampling* non può essere utilizzato per fare il Pap test, per cui in caso di test HPV positivo sarà invitata a fare il Pap test di triage o direttamente la colposcopia, nel corso della quale sarà fatto anche il prelievo per il Pap test.

Le 100 domande sull'HPV
Informazioni approfondite per le utenti

L'utilizzo dell'autoprelievo potrebbe essere uno strumento valido al raggiungimento dell'obiettivo della copertura della popolazione screenata.

AUTOPRELIEVO IN AMBITO GISCI...

- Formazione di un gruppo di lavoro all'interno del 1 livello
- 2 incontri nel 2023
- **FINALITA': - individuare il percorso più corretto per gestire questa tipologia di prelievo**



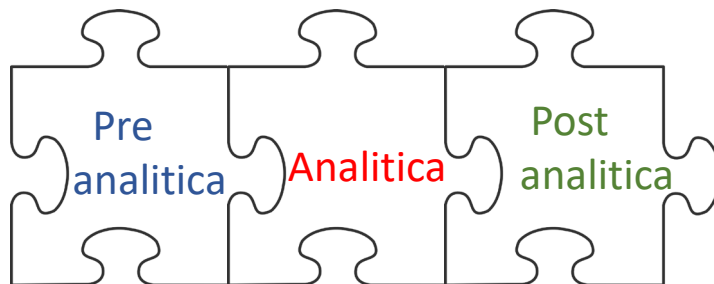
Fase pre e post analitica necessitano di un' organizzazione interdisciplinare



IMPORTANTE collaborazione attiva tra tutti gli attori dello screening

AUTOPRELIEVO IN AMBITO GISCI...

- Creazione di un gruppo di lavoro all'interno del 1 livello
- 2 incontri nel 2023
- **FINALITA': - individuare il percorso più corretto per gestire questa tipologia di prelievo**



- redigere un manuale specifico trasversale → collaborazione con gruppo organizzazione e valutazione
- collaborazione con gruppo 2[^] livello



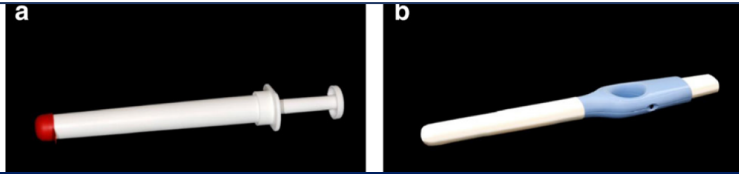
AUTOPRELIEVO: ASPETTI DA CONSIDERARE NEL FLUSSO OPERATIVO DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA



- Self-sample quale **dispositivo** utilizzare:
 - ✓ *dry or wet;*
- Modalità di raccolta:
 - ✓ *lavaggio, spazzola o tampone.*



Importante accettabilità delle donne → brush/tamponi (Daponte, Cancers 2023)



- **Identificazione** del campione:
 - ✓ *Barcode chi e quando applicarlo?*
 - ❖ *L'assistita dopo il prelievo?*
 - ❖ *Dispositivo già barcodato?*
- Dato informatico per il processamento del campione → barcode -donna



AUTOPRELIEVO: ASPETTI DA CONSIDERARE NEL FLUSSO OPERATIVO DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA

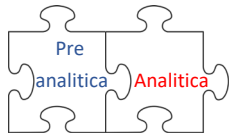


- Self-sample quale dispositivo utilizzare:
 - ✓ *dry or wet;*
- Modalità di raccolta:
 - ✓ *lavaggio, spazzola o tampone.*
- Identificazione del campione
- Modalità di **invio del campione in laboratorio**:
 - ✓ *problema di poste italiane per campioni biologici;*
 - ✓ *esperienza dello screening colon-retto può aiutare;*
 - ✓ *tempo di conservazione dal prelievo al laboratorio;*
 - ✓ *temperatura trasporto;*
 - ✓ *stabilità del campione.*

**IMPORTANTE
PER LE PROSSIME
GARE**

*Esperienza di Ferrara (centro di Bologna) descrive una stabilità dichiarata del campione dry di 15 giorni
Il campione wet sembra avere maggiore stabilità*

AUTOPRELIEVO: ASPETTI DA CONSIDERARE NEL FLUSSO OPERATIVO DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA

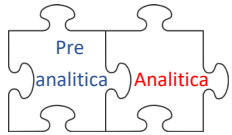


shutterstock.com · 392640556

- In caso di prelievo **dry**:
 - ✓ quale liquido di sospensione (specifico per la preservazione del DNA o per lo strato sottile);
 - ✓ quale volume;
 - ✓ automazione??

- La scelta del dispositivo di prelievo condiziona la pre-analitica del laboratorio
- Risospensione del campione manualmente «*lavoro sporco*»
 - ✓ necessita dell'utilizzo di cappe chimiche
 - ✓ non proponibile per piccoli/grandi numeri
- Quale volume 4- 5 ml o 20 ml :
 - ✓ indicazione dipende dal test/dispositivo utilizzato?
 - ✓ perdita di sensibilità clinica se risospeso in 20 ml (bassa concentrazione virale)?
 - ✓ **VALIDAZIONE**

AUTOPRELIEVO: ASPETTI DA CONSIDERARE NEL FLUSSO OPERATIVO DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA



- In caso di prelievo dry:
 - ✓ quale liquido di sospensione (specifico per la preservazione del DNA o per lo strato sottile);
 - ✓ quale volume;
 - ✓ automazione??

Several steps during the sample preparation of SS specimens in centrally accredited laboratories are critical for quality assurance in SS strategies. This especially applies when specimens arrive at the laboratory in a “dry sample” form, to be later re-suspended in liquid media [12]. Manufacturers are urged to adapt and optimize their platform’s standard protocols for SS implementation; this will simplify pathology laboratory accreditation for self-collection and also enhance daily output [8,12]. With the anticipated growing availability of self-collection, laboratories’ caseload will predictably rise exponentially, requiring investments in pre-analytic automation, both for coping with the increased workflow and for the reduction in potential inter-operator errors [8,12].

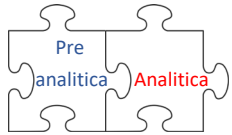


shutterstock.com · 392640556

(Daponte et al, Cancers, 2023)

AUTOPRELIEVO: ASPETTI DA CONSIDERARE NEL FLUSSO OPERATIVO

DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA



- In caso di prelievo wet:
 - ✓ quale liquido di trasporto è migliore;
 - ✓ esistono sistemi con diverse quantità di liquido di trasporto;
 - ✓ automazione??



- Esiste in commercio un sistema automatizzato che offre un approccio flessibile alla preparazione dei campioni per i test molecolari... Ma è l'unico?
- I laboratori hanno solitamente spazi limitati → problematico per molti aggiungere altre strumentazioni
- Esistono sistemi di questo tipo già integrati e utilizzati dai laboratori?
- Il dispositivo per autoprelievo non sarà l'unico campione da analizzare avremo ancora campioni in preservcvt:
 - ✓ devono essere previste strumentazioni ibride
 - ✓ pensare a strumentazioni dedicate



shutterstock.com · 392640556

AUTOPRELIEVO: ASPETTI DA CONSIDERARE NEL FLUSSO OPERATIVO

DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA



➤ I dispositivi hanno la stessa performance, ci sono delle differenze?

Evalyn Brush



(Hawkes et al., *Cancers*, 2020)



An interesting study published by a Norwegian group [17] examined the sensitivity and specificity of the Evalyn brush and a Copan FLOQswab (Copan, Brescia, Italy) compared to clinician-collected samples tested on three PCR-based assays: Cepheid Xpert, Seegene Anyplex II, and the Roche cobas 4800 HPV test. Relative sensitivity, compared to clinician-collected specimens, for CIN3+ demonstrated that the Copan swab was significantly less sensitive than the clinician-collected across all three assays, but that the Evalyn brush was not. The authors presented a further analysis which segregated the results based on the time between collection and specimen preparation (stabilization). If the time between specimen collection and preparation was 28 days or less, there was no longer a significant drop in sensitivity for the Copan swab for CIN3+. There was also variation in which the self-collection device was more sensitive depending on the assay used. Another study [15], comparing the sensitivity for CIN2+ of the Evalyn brush with the Qvintip device (Aprovix, Stockholm, Sweden), found no significant differences between either of the self-collection devices or the clinician-collected sample. For longer intervals between collection and preparation, the Evalyn brush showed similar levels of sensitivity which suggests that this device may be superior when extended delays between collection and processing cannot be avoided [15]. The major concern with using the Evalyn brush, particularly in low- or middle-income countries, is the cost. Prices obviously vary depending on local conditions but the cost of the Evalyn brush appears to be between 3–5 times the price of other self-collection devices, such as the Copan FLOQswab.

➤ I dispositivi hanno la stessa performance, ci sono delle differenze?

Qvintip



There is a direct comparison study by Jentschke and colleagues [16] which provide data that suggest that **the Qvintip may be easier to use and less likely to cause discomfort than the Evalyn brush**. These data also suggest, **although this is not a statistically significant result, that the Qvintip is less sensitive for CIN2+ (83.7%) compared with either the Evalyn brush (89.8%) or a clinician-collected specimen (89.8%)**. The differences in both ease of use and sensitivity are small and it is possible that these differences may stem from the **different instructions for use**; the Evalyn brush was inserted into the vagina and **rotated five times before being removed**, whereas the Qvintip was simply inserted then **removed without any rotation**. **Interestingly, the Qvintip instructions for use [50] now indicate that it should be rotated after insertion into the vagina.**

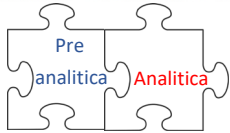
Copan
FLOQSwab



specific type of FLOQswab used is not always described. A small study [51] examining **the Copan self-collection swab compared with a cotton swab determined that the flocked swab was more sensitive for HPV16, HPV18 and for other high-risk HPV types**. **Although numbers of histologically confirmed CIN2+ were low, there was a tendency for better detection by the flocked sample (9 CIN2+) compared with the cotton swab (5 CIN2+)**. Another small study [52] used the Copan ESwab™ for self-collection and compared it to a self-collection sample stabilized on an FTA®-cartridge, and a clinician-collected specimen. **The flocked swab had equal or greater sensitivity than both the FTA®-cartridge and the clinician-collected specimen**. **The flocked swab also matched the clinician-collected sample for detection of cytological high-grade squamous intraepithelial (HSIL) lesions and cervical cancers and was more sensitive than the FTA®-cartridge method**. Both of these studies used the clinically-validated Seegene Anyplex HPV assay.

AUTOPRELIEVO: ASPETTI DA CONSIDERARE NEL FLUSSO OPERATIVO

DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA



➤ I dispositivi hanno la stessa performance, ci sono delle differenze?

Xpert HPV Accuracy on Self-Samples

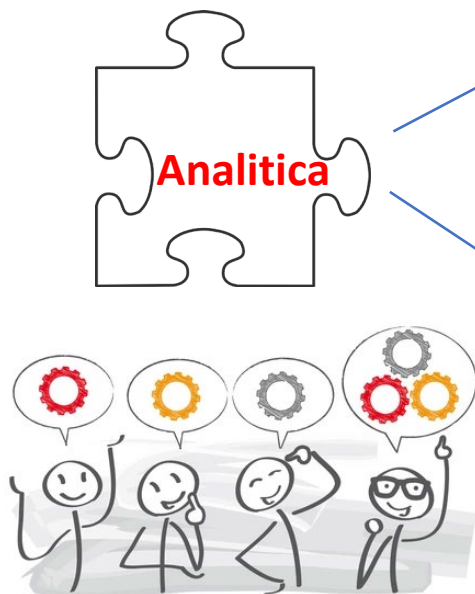
Table 1 Relative Sensitivity and Specificity of the Cepheid Xpert HPV Assay on Clinician-Collected Samples versus Self-Samples

Study group and device	Relative sensitivity (95% CI) of CIN ≥2	Relative sensitivity (95% CI) of CIN3	Relative specificity (95% CI) of CIN <2
Total study population (n = 483)			
Vaginal (E + Q)	0.96 (0.91–1.02)	0.91 (0.82–0.998)	0.96 (0.89–1.04)
Evalyn Brush	0.98 (0.90–1.06)	0.91 (0.80–1.04)	1.06 (0.95–1.19)
Qvintip	0.94 (0.87–1.02)	0.90 (0.78–1.04)	0.88 (0.80–0.98)
Women aged ≥30 years (n = 386)			
Vaginal (E + Q)	0.95 (0.87–1.03)	0.88 (0.77–0.997)	0.95 (0.88–1.03)
Evalyn Brush	0.97 (0.86–1.09)	0.87 (0.71–1.06)	1.06 (0.95–1.17)
Qvintip	0.93 (0.83–1.03)	0.88 (0.74–1.05)	0.87 (0.77–0.98)

CIN, cervical intraepithelial neoplasia; E + Q, samples collected with Evalyn Brush and Qvintip combined.

AUTOPRELIEVO: ASPETTI DA CONSIDERARE NEL FLUSSO OPERATIVO

DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA



shutterstock.com · 392640556

- In caso di prelievo dry
- In caso di prelievo wet
- Differenze tra dispositivi

TEST ANALITICO:

- Test a DNA/RNA validato per lo screening:
 - ✓ *Adeguatezza del campione (housekeeping)*
 - ✓ *Nuove validazioni per l'autoprelievo?;*
 - ✓ *Quali validazioni fare?;*
 - ✓ *Mejer e/o protocollo VALHUDES?.*
- Quali sistemi analitici ;
- Ottimizzazione del cut-off
- Produzione di SOPs* specifiche per autoprelievo :
 - ✓ *Produzione di un manuale dedicato*
- ...altro?

WORK IN PROGRESS

SOPs*: Standard Operating Procedure



AUTOPRELIEVO: DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA TEST ANALITICO

- Esistono le linee guida (criteri di Meijer) per la validazione dei test per HPV nello screening
- Esiste anche un documento GISCI che raccoglie i test validati per lo screening

Per l'autoprelievo disponiamo di qualcosa di simile?

Journal of Clinical Virology 107 (2018) 52-56



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv



VALHUDES: A protocol for validation of human papillomavirus assays and collection devices for HPV testing on self-samples and urine samples

M. Arbyn^{a,*}, E. Peeters^a, I. Benoy^{b,c,d}, D. Vanden Broeck^{b,c,d,e}, J. Bogers^{b,c,d,e}, P. De Sutter^f, G. Donders^{g,h,i}, W. Tjalma^{g,j,k}, S. Weyers^l, K. Cuschieri^m, M. Poljakⁿ, J. Bonde^o, C. Cocuzza^p, F.H. Zhao^q, S. Van Keer^r, A. Vorsters^r



ABSTRACT

Back ground: Systematic reviews have concluded that hrHPV DNA testing using target-amplification tests is as accurate on vaginal self-samples as on clinician-taken specimens for the detection of cervical precancer. However, insufficient evidence is available for specific HPV assay/self-sample device combinations.

Objectives: The VALHUDES protocol is designed as a diagnostic test accuracy study that aims to compare the clinical sensitivity and specificity of particular hrHPV assay(s) on vaginal self-samples and first-void-urine, collected in agreement with standardized protocols, with hrHPV testing on matched clinician-taken samples.

Study design: Five hundred enrolled women referred to a colposcopy clinic are invited to collect a first-void urine sample and one or more vaginal self-samples with particular devices before collection of a cervical sample by a clinician. Sample sets are subsequently analysed in a laboratory accredited for HPV testing. Disease verification for all enrolled patients is provided by colposcopy combined with histological assessment of biopsies.

Results: A first VALHUDES study has started in Belgium in December 2017 with enrolment from four colposcopy centres. The following assays are foreseen to be evaluated: RealTime High Risk HPV assay (Abbott), cobas-4800 and -6800 (Roche), Onclarity (BD), Xpert HPV (Cepheid) and Anyplex II HPV HR (Seegene).


Conclusion: Given empirical evidence that the relative accuracy of HPV-testing on self- vs clinician-samples is robust across clinical settings, the VALHUDES protocol offers a framework for validation of HPV assay/self-sample device combinations that can be translated to a primary screening setting.



AUTOPRELIEVO: TEST ANALITICO

- In particolare il Protocollo VALHUDES indica i requisiti in termini di sensibilità e specificità clinica relativa indicati come ≥ 0.90 e 0.95 rispettivamente
- **ALERT:** valori di sensibilità e specificità clinica relativa VALHUDES più bassi rispetto al test di non inferiorità (**specificità 95% e non più 98%**) → **possibile aumento dei positivi?**
- Il protocollo di studio prevede pertanto il prelievo di campioni autoprelevati (vaginali e/o urina) e parallelamente dalla stessa donna il prelievo cervicale classico effettuato da un operatore sanitario.
- Per valutare l'adeguatezza della sensibilità e specificità clinica relativa è necessario che l'HPV in questione sia stato precedentemente validato su campione cervicale (Arbyn et al.) e che sia una sample size in termini di CIN2+ e CIN2- adeguata alla determinazione della sensibilità e specificità clinica.
- La validazione dell'HPV test su autoprelievo deve includere lo specifico dispositivo di autoprelievo, il terreno / volume di risospensione ed il workflow pre-analitico.
- Deve prevedere la possibilità di estendere la validazione di un test HPV precedentemente validato su autoprelievo con un dispositivo ad altri dispositivi o terreni / volumi o eventuali modifiche nel workflow pre-analitico sempre attraverso studi di validazione.

**IMPORTANTE
PER LE PROSSIME
GARE**

AUTOPRELIEVO: TEST ANALITICO

ipvc2023
APRIL 17-21, 2023 | WASHINGTON DC | IN-PERSON & ONLINE

New guidelines for clinical validation of novel HPV tests usable in cervical cancer screening
Design of VALGENT V / VI

M. Arbyn¹
(1) Unit of Cancer Epidemiology, Belgian Cancer Centre, Solvimes, Brussels, Belgium

*Thank
You!*

HPV test X on self-samples

- 2 criteria
 - Validation criteria fulfilled on cervical clinician-taken samples for test X (vs standard comparator test)
 - Similar sensitivity for CIN2+, for CIN3+; similar specificity of \leq CIN1 of test X on self- vs test X on clinician-samples
- If validation exists for a given HPV test – self-sample handling combination, the validation can be extended towards a modified g combination based on test concordance

AUTOPRELIEVO: DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA WORKFLOW PRE-ANALITICO

Table 2. Parameters that may influence the accuracy of hrHPV testing on vaginal self-samples.

Vaginal self-sample collection procedure:

- Collection device
- Recommended depth of device insertion during collection/device shaft length
- Procedure for self-collection (i.e., number of vaginal rotations during collection)
- Usage of vaginal products (creams, gels, etc.) preceding sample collection (these may result in PCR inhibition)

Self-sample transport:

- Sample resuspended immediately following collection or transported dry to the laboratory
- Sample stability and storage conditions (temperature and time from collection to laboratory processing)
- Transport medium
- Volume of transport medium used for vaginal sample resuspension
- Sample vortexing (intensity and duration) prior to processing

Preanalytical workflow following vaginal sample resuspension:

- Sample starting volume selected for further processing
- Sample centrifugation with resuspension of cellular pellet versus sample starting volume to be used for nucleic acid extraction
- Nucleic acid extraction method: rapid extraction (i.e., rapid heat extraction) versus standard extraction protocols
- Elution volume—volume used for eluting extracted nucleic acids present in the sample starting volume following standard extraction methods

Analytic procedure—HPV testing using PCR-based methods

- Volume of extracted nucleic acids used in PCR mix
 - Positivity criterion in terms of C_t value, viral concentration using standard curve analysis, normalized viral load (viral concentrations adjusted for number of cells per sample)
 - Sample's endogenous control to evaluate sample adequacy and/or “internal” control to check for PCR inhibition, or other metrics.
-

AUTOPRELIEVO: ASPETTI DA CONSIDERARE NEL FLUSSO OPERATIVO DALLA FASE PRE-ANALITICA ALLA POST-ANALITICA



- Quale strategie per le donne risultate positive?
 - ✓ *Invio al 2 livello?*
 - ✓ *Appuntamento in UP?*
 - ✓ ...

- Quale triage per i campioni risultati positivi?:
 - ✓ *Utilizzo di nuovi biomarcatori;*
 - ✓ ...

frontiers | Frontiers in Oncology

TYPE Review
PUBLISHED 22 September 2023
DOI 10.3389/fonc.2023.1243888

[Check for updates](#)

OPEN ACCESS

EDITED BY
Anthony Taylor,
University of Leicester, United Kingdom

REVIEWED BY
Missaoui Nabiba,
University of Sousse, Tunisia
Mirella Fortunato,
Azienda Sanitaria Ospedaliera S.Croce e
Carle Cuneo, Italy

*CORRESPONDENCE

Molecular triaging options for women testing HPV positive with self-collected samples

Katayoun Taghavi^{1*}, Fanghui Zhao², Laura Downham¹, Armando Baena¹ and Partha Basu¹

¹Early Detection, Prevention and Infections Branch, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, ²Department of Cancer Epidemiology, National Cancer Center/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, China



shutterstock.com · 392640556

CONCLUSIONI

COSA E' EMERSO DAL BRAIN STORMING

- 📌 Esistono molti dispositivi nel mercato;
 - Esistono molte criticità legate alla pre-analitica in laboratorio che dipende dal dispositivo utilizzato;
 - Le strumentazioni utilizzabili devono prevedere automazione;
- 📌 Per i test da utilizzare con autoprelievo serve una validazione specifica per il tipo di dispositivo utilizzato oltre a quella di test per lo screening;
 - Validazione anche dell'intero flusso operativo;
 - E' ancora un working progress...

Argomento multidisciplinare dove la collaborazione è importante perché i flussi sembrano distinti...in realtà sono uniti tra loro e la decisione su uno di questi ricade sul flusso seguente

***GRAZIE PER
L'ATTENZIONE!!!***



Gruppo di lavoro 1^a livello

Autoprelievo:

S. Bulletti,

F. Carozzi,

C. Cocuzza,

A. Chiereghin,

L. De Marco,

A. Del Mistro,

S. Gori,

D. Gustinucci,

V. Nofrini,

B. Passamonti,

C. Sani