

Test HPV primario nello screening per il cervicocarcinoma: valutazione della riproducibilità e indagine sull'esito citologico dei campioni borderline al test Hybrid Capture 2

HPV primary test in the cervical cancer screening: reproducibility assessment and investigation on cytological outcome of Hybrid Capture 2 borderline samples

Elena Burrioni,¹ Cristina Sani,¹ Simonetta Bisanzì,¹ Cristina Ocello²

¹ Laboratorio regionale HPV e biologia molecolare, Istituto per lo studio e la prevenzione oncologica (ISPO), Firenze

² Consulente statistico

Corrispondenza: Elena Burrioni; e.burrioni@ispo.toscana.it

RIASSUNTO

OBIETTIVI: valutare la riproducibilità del test High Risk-Hybrid Capture 2 (HR-HC2, Qiagen) all'interno del percorso di screening con test HPV primario, per valori molto vicini al *cut-off* (*borderline*), ovvero con $0,80 \leq \text{RLU/CO} \leq 0,99$ (RLU/CO: *relative light units/cut-off*), e al contempo valutare l'eventuale presenza di lesioni di alto grado.

DISEGNO: tutti i campioni risultati *borderline* da gennaio 2014 ad agosto 2015 sono stati rivalutati tramite test HR-HC2 entro due settimane dal primo test. Per i campioni HPV positivi alla ripetizione è stato analizzato il risultato citologico e colposcopico.

SETTING E PARTECIPANTI: le indicazioni nazionali e internazionali raccomandano l'utilizzo del test HPV come test primario nello screening del cervicocarcinoma per le donne di età 30/34-64 anni. In regione Toscana l'HPV come test primario è stato introdotto nel 2013 e il tipo di test in uso, HR-HC2, ha un *cut-off* di positività ≥ 1 RLU/CO.

PRINCIPALI MISURE DI OUTCOME: proporzione di test HPV positivi alla ripetizione, stratificata anche per tipologia di materiale (ThinPrep, STM) e per le seguenti sottoclassi di RLU/CO: 0,80-0,89 e 0,90-0,99.

RISULTATI: sono risultati *borderline* al primo test HR-HC2 253 campioni, circa lo 0,4% di tutti i campioni testati. Circa l'83% (209/253) dei campioni si è confermato negativo alla ripetizione del test HPV, di cui l'88% per RLU/CO 0,80-0,89 e il 76% per RLU/CO 0,90-0,99 (p-value=0,014). Il valore RLU/CO mediano dei 44 campioni positivi al test HPV alla ripetizione è 1,4, con un valore massimo di 16,7 RLU/CO. Inoltre, risulta che il 90% dei campioni positivi alla ripetizione hanno un valore RLU/CO inferiore o pari a 3,6. Anche il sistema di prelievo utilizzato influisce sulla riproducibilità: il 26,4% (33/125) dei campioni in ThinPrep risulta positivo alla ripetizione *vs.* l'8,6% (11/128) di quelli in STM, p-value<0,001. Il risultato citologico dei campioni HPV positivi alla ripetizione ha evidenziato l'84% (37/44) di citologie normali e 7 lesioni intraepiteliali squamose di basso grado (LSIL). Nessuna lesione di alto grado (HSIL) è stata trovata nei soggetti che hanno effettuato approfondimenti di secondo livello.

CONCLUSIONE: come atteso, la riproducibilità diminuisce per i valori più vicini al *cut-off* (0,90-0,99), confermando il limite intrinseco a tutti i metodi in prossimità del *cut-off*. Inoltre, anche se la differenza nella riproducibilità tra i due sistemi di prelievo è statisticamente significativa, nei campioni positivi alla ripetizione non si trovano lesioni di alto grado al momento del test HPV di screening.

Parole chiave: riproducibilità del test HPV HR-HC2, screening cervicale con test HPV, campioni *borderline* con test HPV, risultato citologico

ABSTRACT

OBJECTIVES: to evaluate the reproducibility of the High-Risk Hybrid Capture 2 (HC2-HR, Qiagen) test within the frame of cervical cancer screening with HPV, for samples with values very close to the cut-off (*borderline*), that is $0.80 \leq \text{RLU/CO} \leq 0.99$ (RLU/CO: *relative light units/cut-off*) and to assess any possible presence of high grade lesions.

DESIGN: all *borderline* samples collected from January 2014 to August 2015 were repeated with HR-HC2 test within two weeks from the first test. For HPV-positive samples, cytology and colposcopy results (if present) were analysed.

SETTING AND PARTICIPANTS: national and international directions recommend the use of HPV testing as a primary test for cervical cancer screening for women aged 30/34-64 years. In Tuscany Region (Central Italy) the primary screening with HPV test was introduced in 2013 and the HPV test currently used, HR-HC2, has a positive cut-off ≥ 1 RLU/CO.

MAIN OUTCOME MEASURES: proportion of HPV-positive tests at repetition, then stratified by type of material (ThinPrep, STM) and for the following subclasses of RLU/CO: 0.80-0.89 and 0.90-0.99.

RESULTS: 253 samples were *borderline* at first test with HR-HC2 (about 0.4% of all samples tested). About 83% (209/253) of the samples was confirmed to be negative at the HPV test repetition: 88% for RLU/CO=0.80-0.89 and 76% for RLU/CO=0.90-0.99 (p-value=0.014). Median RLU/CO value of 44 HPV-positive samples at repetition is 1.4, with a maximum RLU/CO value of 16.7. In addition, 90% of HPV-positive samples at repetition has a RLU/CO values below or equal to 3.6. Even the used sampling system affects reproducibility: 26.4% (33/125) of the samples resulted positive at the repetition were in ThinPrep *vs.* 8.6% (11/128) of those in STM (p-value<0.001). The cytology result of HPV positive samples at repetition showed 84% (37/44) of normal samples and 7 low-grade lesions. No high-grade lesion was found in people who performed a colposcopy.

CONCLUSION: as expected, the reproducibility decreases for values closest to the cut-off (0.90-0.99), confirming the intrinsic limit to all analytical methods near to the cut-off. Moreover, even if the difference in reproducibility between the two systems of sampling is statistically significant, in samples that resulted positive at repetition high-grade lesions were not found at the time of HPV screening test.

Keywords: HPV HR-HC2 test reproducibility, cervical cancer screening with HPV test, *borderline* samples with HPV test, cytological result

Cosa si sapeva già

- La riproducibilità del test HPV è particolarmente problematica in prossimità del *cut-off*: i pochi dati a disposizione attestano una riproducibilità variabile dal 14% al 30% per valori di $0,5 \leq \text{RLU/CO} < 1$.
- La riproducibilità del test HPV è particolarmente importante nel contesto di screening cervicale, in quanto un esito negativo determina una ripetizione a 5 anni.

Cosa si aggiunge di nuovo

- Buona riproducibilità dei campioni *borderline* con il test HR-HC2.
- Differenza nella riproducibilità tra i due sistemi di prelievo ThinPrep e STM.
- Dati su esito citologico per questa categoria di campioni probabilmente più a rischio.

INTRODUZIONE

Il carcinoma della cervice uterina è attribuibile all'infezione da Papillomavirus umano (HPV) ad alto rischio oncogeno (o *high risk*, HR) nella quasi totalità dei casi. Nel 2009 l'Agencia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) ha stabilito che i tipi di HPV sicuramente cancerogeni sono 12 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59).¹ A livello mondiale il 50% circa dei carcinomi cervicali sono attribuiti al tipo 16 e il 20% circa al tipo 18, con scarse variazioni geografiche. La storia naturale dell'infezione da HPV indica che la persistenza dell'infezione da HPV di alto grado è necessaria per lo sviluppo delle lesioni intraepiteliali.²

Lo screening cervicale ha come obiettivo l'individuazione e il trattamento delle lesioni preinvasive, prevenendo così i tumori invasivi. Le attività di screening cervicale organizzate sono in atto da molti anni nella maggior parte dei Paesi industrializzati, inclusa l'Italia, con variazioni in base alle diverse aree geografiche.³ In generale, nelle Regioni del Centro-Nord l'offerta di programmi organizzati è maggiore rispetto a quella delle Regioni meridionali. Fino a pochi anni fa la citologia cervicovaginale era utilizzata come test primario per le donne di età compresa tra i 25 e i 65 anni. A seguito, quindi, di un Pap test normale, la donna veniva invitata a ripetere il test dopo 3 anni. Le evidenze scientifiche decisive emerse a partire dal 2007, ottenute da sei trial randomizzati europei che hanno paragonato la *performance* del test per la ricerca di HPV ad alto rischio oncogeno (HR-HPV) con quella del Pap test tradizionale nell'ambito dello screening del cervicocarcinoma,⁴⁻¹⁴ hanno suggerito l'applicazione di test molecolari per la ricerca di HR-HPV nei programmi di screening. Le prime indicazioni a tal riguardo sono state pubblicate nel volume dedicato all'*health technology assessment*, sup-

plemento di *Epidemiologia&Prevenzione* del 2012,¹⁵ e nel Documento di indirizzo sull'utilizzo del test HPV-DNA come test primario per lo screening del cancro del collo dell'utero prodotto nell'ambito delle azioni centrali del Piano nazionale della prevenzione 2010-2012,¹⁶ seguite recentemente dalla seconda edizione dei *supplements* alle *European Guidelines for quality assurance in cervical cancer screening* (2015).¹⁷ Tali linee guida raccomandano l'utilizzo del test HPV all'interno di programmi di screening organizzato per la fascia d'età superiore a 35 anni, o comunque non prima dei 30 anni, e l'intervallo da utilizzare dopo un test di screening negativo (almeno 5 anni). Sono, inoltre, riportate le modalità di gestione delle donne con test HPV positivo, ovvero l'utilizzo della citologia di triage.

Il programma con HPV primario ha avuto avvio in Regione Toscana nel 2013, attraverso un'implementazione graduale che ha coinvolto nella fase iniziale 3 Aziende (ASF 10 Firenze, ASL 9 Grosseto, ASL 12 Viareggio) e invitato le donne di età 55-64 anni. Dal 2014 l'invito è stato esteso a tutta la popolazione bersaglio di 34-64 anni residente nel territorio afferente alle tre aziende sanitarie.

Le delibere regionali che hanno dato avvio al processo (1235/2012, 1049/2012 e 741/2014) hanno previsto la centralizzazione di tutti i test per lo screening del carcinoma della cervice uterina in un unico laboratorio: il Laboratorio regionale HPV dell'Istituto per lo studio e la prevenzione oncologica (ISPO). Le altre aziende della Regione Toscana prenderanno parte al programma di screening con test HPV primario a partire da settembre 2016. Il protocollo di screening regionale prevede che le donne ricevano una lettera di invito per presentarsi all'ambulatorio dedicato, dove un'ostetrica esegue il prelievo di cellule cervicali su cui verrà effettuato il test HPV. Il prelievo è poi inviato al laboratorio dove viene analizzato per verificare la presenza di HR-HPV. Se il risultato del test HPV è negativo, la donna viene richiamata al successivo round di screening dopo 5 anni; se il test HPV è positivo, viene allestito e letto il Pap test di triage. Se il Pap test risulta negativo, la donna viene invitata a ripetere il test HPV dopo un anno; mentre se il Pap Test risulta positivo, la donna viene richiamata per l'esecuzione di una colposcopia.

I test molecolari applicabili in un contesto di screening devono essere standardizzati, validati e avere una sensibilità e specificità clinica ottimali per lesioni di alto grado.¹⁸ Nello screening, infatti, la *performance* del test HR-HPV non deve essere misurata su una maggior sensibilità analitica (individuazione anche di un numero limitato di copie virali), ma sulla capacità di evidenziare le infezioni da HR-HPV clinicamente rilevanti.

Per la validazione e introduzione di nuovi test HR-HPV in ambito di screening primario vengono pertanto recepi-

te le indicazioni contenute in un recente articolo di Meijer et al,¹⁸ che stabilisce i criteri per la validazione di nuovi test consentendo il confronto del «nuovo test» rispetto al «test validato».

I sistemi utilizzati nei trial di grandi dimensioni che hanno valutato il test HPV come test di screening primario sono High-Risk Hybrid Capture 2 (HR-HC2) e GP5+/GP6+ PCR-EIA. Il primo, largamente diffuso, utilizzato anche nel trial italiano New Technologies for Cervical Cancer Screening (NTCC), individua i tipi ad alto rischio, ma non consente di discriminare il tipo specifico. Si tratta di un saggio molto robusto che ha rivelato un'elevata riproducibilità tra ed entro i centri.¹⁹ Per garantire un'elevata qualità, è sufficiente avere esperienza e mettere in atto attività sistematiche di controllo di qualità interne ed esterne che garantiscano l'accuratezza del risultato. Il test HR-HC2 può essere effettuato sia su campioni raccolti e conservati in sistemi di prelievo specifici per questo sistema (Speciment Transport Medium, STM DNA PAP cervical sampler, Qiagen, Gaithersburg, MD, USA), sia su campioni cellulari raccolti in tamponi di prelievo specifici per la citologia in fase liquida (ThinPrep PreservCyt Solution; Hologic Inc, Marlborough, MA, USA; Surepath BD, Burlington, NC, USA).

Il test HPV attualmente utilizzato in Regione Toscana per lo screening primario è il test HR-HC2. Si tratta di un test commerciale su micropiastra, validato e approvato dalla US Food and Drug Administration, in grado di individuare il DNA di 13 HPV classificati come cancerogeni (gruppi 1 e 2A: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68) e dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro.¹ Tutti i campioni con un rapporto unità di luce relativa/cut-off (RLU/CO) uguale o superiore a 1 vengono considerati positivi, tutti i campioni con RLU/CO inferiore a 1 campione sono considerati negativi al test HPV. Un campione negativo può, quindi, avere un RLU/CO che varia da 0,01 a 0,99. Questo non significa che il virus sia realmente assente, ma semplicemente può anche essere presente a una concentrazione inferiore al cut-off del metodo. Il cut-off analitico del test HR-HC2 è 0,30 RLU/CO, come riportato da Lorinz nel 1996.²⁰

La gestione clinica di una donna con test HPV negativo è la stessa indipendentemente dal valore di RLU/CO < 1. Precedenti studi²¹ hanno dimostrato che il test HR-HC2 è sensibile e specifico per la rilevazione di HR-HPV DNA da campioni cervicali, ma il suo utilizzo all'interno di programmi di screening rende necessaria una maggiore attenzione su alcune sue caratteristiche intrinseche, come per esempio la riproducibilità del test. Infatti il processo, nella sua complessità, include una serie di passaggi critici che, se non correttamente monitorati e ottimizzati, potrebbero potenzial-

mente dar luogo a risultati falsamente negativi. Pertanto una buona riproducibilità dei risultati dei campioni clinici, associata a un solido programma di garanzia della qualità, assicura l'elevata affidabilità dei risultati del test.

L'obiettivo di questo studio è di valutare la riproducibilità del test HR-HC2 per risultati molto vicini al cut-off, ovvero con $0,80 \leq \text{RLU/CO} \leq 0,99$, e di valutare l'esito citologico di quei campioni che, ripetuti, sono risultati HPV positivi e l'esito colposcopico per i campioni con citologia anormale.

MATERIALI E METODI

DISEGNO DELLO STUDIO

Da gennaio 2014 ad agosto 2015 tutti i campioni afferenti allo screening con HPV primario della Regione Toscana, inclusi i richiami a un anno, sono stati processati presso il Laboratorio regionale di prevenzione oncologica di ISPO tramite il test HR-HC2. Per eseguire il test HR-HC2 (Qiagen, Gaithersburg, USA) è stato utilizzato solo il mix di sonde B, ovvero le sonde *high-risk* progettate per individuare i tipi cancerogeni di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 (gruppo 1) e 68 (probabile cancerogeno per gli umani, gruppo 2).¹

I risultati sono espressi come rapporto tra l'intensità di emissione di luce del campione (unità di luce relativa, RLU) e la media di 3 ripetizioni consecutive del calibratore positivo (fornito con il test) contenente 1 pg/mL di DNA di HPV 16. La soglia di sensibilità clinica di 1 RLU/CO (equivalente a 5.000 copie virali per test) rappresenta il cut-off del metodo. I campioni sono considerati HR-HPV positivi se il rapporto RLU/CO è ≥ 1 , come raccomandato dal produttore. I campioni definiti *borderline*, cioè quelli con risultato $0,80 \leq \text{RLU/CO} \leq 0,99$ al test HR-HC2, sono stati ripetuti entro due settimane dal primo test. Se alla ripetizione il campione si confermava negativo (per qualsiasi valore di RLU/CO tra 0,01 e 0,99), la donna riceveva una risposta negativa al test ed era invitata a ripeterlo dopo 5 anni, come da protocollo di screening.

Se, al contrario, la ripetizione al test dava un risultato positivo RLU/CO ≥ 1 , la risposta al test di screening era considerata positiva, per cui veniva allestito e letto il Pap test di triage.

Se il Pap test di triage riscontrava un'anormalità citologica (\geq lesione intraepiteliale squamosa di basso grado, LSIL) la donna veniva chiamata a effettuare una colposcopia.

Il campione utilizzato per le analisi di questo studio è costituito da tutti i campioni cervicali afferenti ai programmi di screening delle Aziende sanitarie di Firenze, Grosseto e Viareggio coinvolte nel programma di screening con HPV primario promosso dalla Regione Toscana, il cui prelievo è stato effettuato nel periodo gennaio 2014-agosto 2015

che sono risultati *borderline* al primo test HPV HR-HC2. Per i campioni raccolti in mezzo di trasporto per citologia in fase liquida (ThinPrep solution, Hologic), il test HC2 è preceduto dalla fase di conversione del campione eseguita con l'estrattore QIASymphony SP e il kit QIASymphony DSP HPV media (Qiagen).

ANALISI STATISTICHE

Ai fini dell'obiettivo del presente studio, è stata calcolata la proporzione di campioni di screening *borderline* che alla ripetizione del test HPV sono risultati positivi ($RLU/CO \geq 1$). Sono state poi stimate e confrontate le proporzioni di campioni positivi alla ripetizione stratificate per sottocategorie ($0,80 \leq RLU/CO \leq 0,89$ e $0,90 \leq RLU/CO \leq 0,99$) e per tipo di materiale usato nel prelievo del campione (STM e ThinPrep). Le differenze nelle proporzioni sono state valutate con il test del χ^2 di Pearson. Le analisi sono state effettuate utilizzando il pacchetto statistico STATA 12.

RISULTATI

Da gennaio 2014 ad agosto 2015 sono stati eseguiti 71.242 test HPV di screening e di richiamo a 1 anno afferenti alle ASF 10, ASL 9 e ASL 12: di questi, 51.827 erano campioni in STM e 19.415 erano campioni in ThinPrep; 253 campioni sono risultati *borderline* al primo test HPV (circa 0,35% di tutti i campioni testati; 253/71.242). Di questi 125 erano campioni in ThinPrep (0,6% di tutti i campioni in fase liquida; 125/19.415) e 128 erano campioni in STM (0,2%; 128/51.827) (figura 1). Stratificando il campione in due sottocategorie in base al

valore RLU/CO (0,80-0,89 e 0,90-0,99, rispettivamente), si ottiene che circa il 55% dei campioni (140/253) appartiene alla prima categoria e circa il 45% (113/253) alla seconda.

Circa l'83% (209/253) dei campioni si è confermato negativo alla ripetizione del test HPV (tabella 1). Tra i campioni che alla ripetizione sono risultati HPV positivi (n. 44), il 90% ha un valore $RLU/CO \leq 3,62$, mentre il valore mediano risulta pari a 1,39 RLU/CO , con un massimo di 16,71 RLU/CO .

Confrontando la proporzione di campioni positivi alla ripetizione per sottocategorie di RLU/CO , si osserva una differenza statisticamente significativa tra le due sottocategorie: nella prima (0,80-0,89) il 12% (17/140) dei campioni ripetuti sono risultati positivi al test HPV *vs.* il 24% (27/113) dei campioni nella seconda sottocategoria (0,90-0,99); p -value=0,014 (tabella 1).

Anche il sistema di prelievo utilizzato influisce sulla riproducibilità. Infatti, stratificando i campioni per tipo di materiale utilizzato per il prelievo (STM o ThinPrep), si osserva che il 26,4% (33/125) dei campioni in ThinPrep risulta positivo alla ripetizione *vs.* l'8,6% (11/128) di quelli in STM; tale differenza risulta statisticamente significativa (p -value<0,001) (tabella 2). La tabella 2 mostra, inoltre, che risultati simili si ottengono se si confrontano i risultati stratificando per classe di RLU/CO : nella sottoclasse 0,80-0,89 si osserva che la proporzione di campioni STM positivi alla ripetizione risulta 3,9% *vs.* 21,9% di campioni in ThinPrep (p -value=0,001); così come nella sottoclasse 0,90-0,99 si osserva una proporzione di cam-

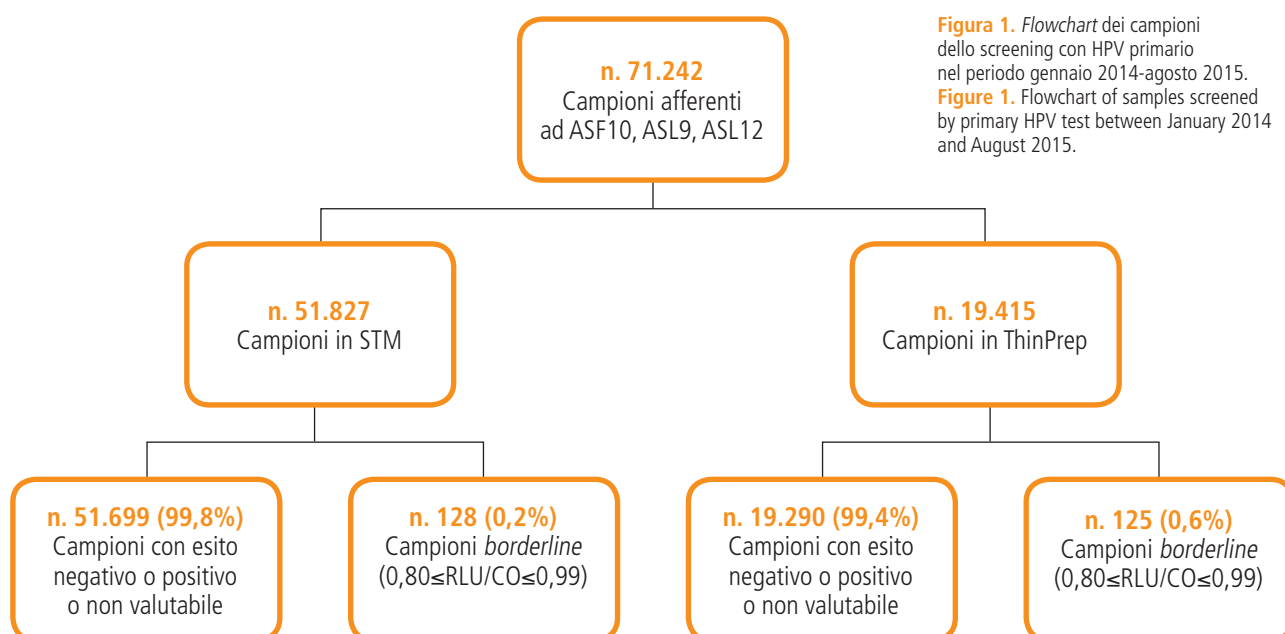


Figura 1. Flowchart dei campioni dello screening con HPV primario nel periodo gennaio 2014-agosto 2015.
Figure 1. Flowchart of samples screened by primary HPV test between January 2014 and August 2015.

VALORE RLU/CO	RISULTATO TEST HPV ALLA RIPETIZIONE		
	POSITIVO n. (%)	NEGATIVO n. (%)	TOTALE n. (%)
0,80-0,99	44 (17,4)	209 (82,6)	253 (100,0)
0,80-0,89	17 (21,1)*	123 (87,9)	140 (100,0)
0,90-0,99	27 (23,9)	86 (76,1)	113 (100,0)

* La differenza nella proporzione di campioni positivi al test HPV alla ripetizione tra le due sottoclassi di RLU/CO risulta statisticamente significativa (p-value=0,014). / The difference in the proportion of HPV positive samples between the two RLU/CO classes is statistically significant (p-value=0.014).

Tabella 1. Distribuzione del risultato del test HPV alla ripetizione per classi di valori di RLU/CO.

Table 1. Distribution of HPV test result at repetition, overall and by RLU/CO classes.

MATERIALE DI PRELIEVO*	RISULTATO TEST HPV ALLA RIPETIZIONE		
	POSITIVO n. (%)	NEGATIVO n. (%)	TOTALE n. (%)
STM	11 (8,6)	117 (91,4)	128 (100,0)
0,80-0,89	3 (3,9)	73 (96,1)	76 (100,0)
0,90-0,99	8 (15,4)	44 (84,6)	52 (100,0)
ThinPrep	33 (26,4)*	92 (73,6)	125 (100,0)
0,80-0,89	14 (21,9)	50 (78,1)	64 (100,0)
0,90-0,99	19 (31,1)	42 (68,9)	61 (100,0)
Totale	44 (17,4)	209 (82,6)	253 (100,0)

* La differenza nella proporzione di campioni positivi al test HPV alla ripetizione tra i due sistemi di prelievo risulta statisticamente significativa (p-value<0,001). / The difference in the proportion of HPV positive samples between the two RLU/CO classes is statistically significant (p-value<0.001).

Tabella 2. Distribuzione del risultato del test HPV alla ripetizione, per tipo di materiale usato per il prelievo e classe di RLU/CO.

Table 2. HPV test result at repetition, overall and by RLU/CO classes.

pioni positivi pari al 15,4% vs. 31,1%, rispettivamente per STM e ThinPrep, statisticamente significativa (p=0,05). Analizzando il risultato citologico dei campioni HPV positivi alla ripetizione si è notato che l'84% (37/44) dei campioni HPV positivi alla ripetizione ha avuto un risultato citologico normale, mentre 7 sono risultati LSIL. Nessuna lesione di alto grado è stata comunque riscontrata nei soggetti che hanno effettuato approfondimenti di secondo livello.

DISCUSSIONE

Questo studio descrive la valutazione sistematica della riproducibilità intralaboratorio del test clinico HR-HC2 (Qiagen) utilizzato dal Laboratorio regionale HPV di ISPO all'interno del programma di screening regionale per il cancro del collo dell'utero. Lo studio è stato progettato per monitorare l'accuratezza del test HR-HC2 in un laboratorio con un'elevata esperienza e che esegue annualmente un numero elevato di test (più di 50.000 test/anno).

La prima informazione che emerge da questo studio riguarda l'impatto in termini numerici dei campioni *borderline* all'interno di un programma di screening prima-

rio con il test HPV. Questo dato, che si attesta intorno allo 0,4%, suggerisce che il numero di campioni *borderline* è comunque limitato, anche se la ripetizione di questi campioni richiede una certa organizzazione (tempo dal test alla ripetizione, programmazione della ripetizione del test).

I risultati riportano che il test HR-HC2 mostra una buona riproducibilità intralaboratorio per i campioni negativi che hanno un valore di RLU/CO molto vicino alla positività. Come è noto, per qualsiasi dosaggio con *cut-off* di positività la riproducibilità più bassa si osserva normalmente in campioni con risultato più vicino al *cut-off* stesso; tale concetto si conferma anche per il test HR-HC2.²² Circa l'83% dei campioni *borderline* ritestati si sono confermati negativi al test HPV, percentuale che si avvicina al 90% per i campioni con *ratio* 0,80-0,89 e intorno al 76% per i campioni con *ratio* 0,90-0,99; p-value=0,014.

In letteratura esistono pochi dati sulla riproducibilità del test HR-HC2 nei campioni negativi;^{19,22} inoltre, nessuno studio ha analizzato tale riproducibilità all'interno di un contesto di screening né in maniera sistematica monitorando il processo in un lungo periodo di tempo. Nel caso qui presentato, invece, sono stati ripetuti tutti i campioni *borderline* osservati nell'arco di circa 20 mesi.

Inoltre, i dati pubblicati fino a ora sono stati ottenuti su un numero limitato di campioni. Nessuno studio ha valutato la riproducibilità dei campioni con intervallo di RLU/CO molto prossimo al *cut-off* del test HR-HC2, ma hanno soltanto suddiviso per categorie più ampie, come per esempio RLU/CO<1 o in due classi RLU/CO≤0,5 e 0,5<RLU/CO<1.

Nonostante queste differenze, i risultati qui presentati mostrano un'elevata precisione del metodo e sono in linea con i risultati ottenuti da Carozzi et al. con campioni dello studio NTCC¹⁹ e da Ibanez et al:²² 27% di discordanza per i campioni in STM con 0,90<RLU/CO<0,99; 13,7% di discordanza per i campioni con valore di 0,5≤RLU/CO<1.

La riproducibilità del test HR-HC2 dipende da fattori che influenzano la sensibilità e la specificità della reazione: prelievo, conservazione, trasporto e processamento dei campioni biologici, concentrazione del target, presenza di inibitori di reazione, verificarsi di ibridazione non specifica, mancanza di ottimizzazione in una o più fasi del processo. In particolare, campioni raccolti in soluzioni contenenti fissativo (che permettono la preparazione del vetrino citologico) richiedono una fase aggiuntiva di preparazione per il test HR-HC2. Questa fase di conversione del campione, necessaria per eliminare il fissativo, è un passaggio critico per la denaturazione del DNA.¹⁹ La diversa riproducibilità dei campioni *borderline* in ThinPrep rispetto ai campioni in STM osservata nello studio qui presentato, statisticamente significativa, può essere attribuita a que-

sta fase critica di conversione necessaria per i campioni in ThinPrep. Inoltre, per ristare i campioni in ThinPrep è necessario ripetere la fase di conversione, eseguita con l'estrattore QIASymphony SP (Qiagen), quindi utilizzare una nuova aliquota di campione, diversamente dalle ripetizioni dei campioni in STM che sono eseguite sullo stesso campione già denaturato. Un'altra possibile spiegazione della diversa riproducibilità è che i campioni in ThinPrep non sono omogenei, e come risultato sono presenti concentrazioni più basse di cellule infettate da HPV (per unità di volume) quando il campione viene esaurito, riducendo così la positività al test HR-HC2.²³

Un limite di questo studio può essere rappresentato dal fatto che la diagnosi citologica, ed eventualmente colposcopica, è disponibile solo per i campioni risultati positivi alla ripetizione, mentre non si hanno altre informazioni su tutti i campioni confermati HPV negativi. Per capire quanto questo *bias* possa influire sulla solidità dei risultati, sono stati analizzati i risultati dei campioni della prima fase dello studio NTCC in cui su tutti i campioni prelevati in ThinPrep veniva eseguito sia il test HPV-HR sia la citologia. In questa analisi, su 4.263 campioni ne sono stati individuati 77 con risultato HPV-HR *borderline* ($0,80 \leq \text{RLU/CO} \leq 0,99$), ovvero l'1,8%. Percentuale superiore rispetto allo 0,6% osservato nel presente studio, probabilmente dovuta al fatto che nello studio NTCC la conversione dei campioni in ThinPrep veniva eseguita manualmente e non con l'estrattore automatico Qiasymphony SP; 75/77 campioni *borderline* avevano citologia normale e solo 2 avevano citologia ASC-US (cellule atipiche squamose di significato incerto), il cui esito colposcopico era negativo.

È interessante sottolineare che tutte le 74 pazienti che hanno aderito al primo round di screening successivo all'arruolamento, ovvero 3 anni dopo il primo test HPV, hanno avuto un risultato citologico negativo. Delle 63 che hanno aderito al secondo round di screening, ovvero 6 anni dopo il primo test HPV, è stata riscontrata una sola lesione LSIL con successiva colposcopia negativa. Questi dati confermano l'evidenza che anche per i casi in cui l'infezione da HPV è presente a livello subclinico nel campione, cioè con una carica virale bassa e non evidenziata dai test di screening utilizzati, di fatto non produce nella paziente le modificazioni morfologiche in grado di portare all'insorgere di una lesione di grado elevato. Si conferma, quindi, la solidità del protocollo di screening che prevede un richiamo a 5 anni per le donne HPV-HR negative.

Come ulteriore indagine, per capire quanto sia basso il rischio delle donne con risultati *borderline*, è stato indagato l'esito citologico dei campioni con RLU/CO molto prossimo a 1. È stato scelto come intervallo un valore di RLU/CO compreso tra 1 e 5, poiché il 90% dei campioni *borderline* positivi alla ripetizione aveva un RLU/CO < 4.

Tra i 71.242 campioni analizzati nel periodo gennaio 2014-agosto 2015, 1.602 avevano un RLU/CO al primo test compreso tra 1 e 5; di questi, l'84,3% (1.350/1.602) aveva un esito negativo alla citologia di triage, mentre il 9,7% (156/1.602) aveva lesioni di basso grado (LSIL), il 3,7% (59/1.602) aveva lesioni di alto grado (48 ASC-H, 5 HSIL e 6 AGC) e il 2,3% (37/1.602) era inadeguato. Non è stato possibile recuperare il risultato colposcopico di tutti questi campioni, per cui ci si deve limitare al confronto con l'esito citologico.

Il valore predittivo positivo (VPP) per lesioni di alto grado nei campioni con RLU/CO 1-5 è 2,3% *vs.* lo 0% dei campioni *borderline* che alla ripetizione sono risultati positivi. Dal confronto emerge, quindi, che i campioni *borderline* positivi alla ripetizione hanno un rischio di lesioni di alto grado decisamente inferiore rispetto ai campioni positivi al primo test, con RLU/CO molto prossimo a 1, a conferma che il protocollo di screening attuale è assolutamente adeguato per la gestione delle donne HPV-HR negative.

CONCLUSIONE

La corretta gestione dei pazienti, la sicurezza del processo e i suoi costi sono strettamente collegati alla solidità del test di screening utilizzato. In ambito di screening, infatti, è essenziale che ogni laboratorio di screening sia in grado di garantire la qualità e l'affidabilità del test che utilizza attraverso una serie di accorgimenti, come la messa in atto di pratiche di laboratorio di alto livello (*good laboratory practice*), l'uso di appropriati controlli di qualità interni (intra-test e pre-test) e l'adesione a programmi di verifica esterna della qualità (VEQ).

In questo scenario si inserisce anche la valutazione della riproducibilità dei campioni *borderline* che permette di monitorare l'adeguatezza delle *performance* del sistema.

Conflitti di interesse dichiarati: nessuno.

Finanziamento: lo studio presentato in questo articolo è stato selezionato dalla giuria del convegno nazionale Gruppo italiano screening cervicale (GISCI) del 2015 come miglior ricerca nell'ambito dei programmi di screening organizzati per la prevenzione del cervicocarcinoma. Il GISCI ha deciso di finanziarne la pubblicazione in *fast-track* su *Epidemiologia&Prevenzione*, condizionata al superamento della *peer-review* condotta dal comitato editoriale della rivista.

BIBLIOGRAFIA

1. Bouvard V, Baan R, Straif K et al. A review of human carcinogens – Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009;10(4):321-22.
2. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:14-9.
3. La sorveglianza PASSI. Screening cervicale. Disponibile all'indirizzo: <http://www.epicentro.iss.it/passi/dati/ScreeningCervicale.asp>
4. Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet* 2007;370(9601):1764-72.
5. Kitchener HC, Almonte M, Thomson C et al. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2009;10(7):672-82.
6. Naucler P, Ryd W, Tornberg S et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007;357(16):1589-97.
7. Naucler P, Ryd W, Tornberg S et al. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(2):88-99.
8. Kotaniemi-Talonen L, Nieminen P, Anttila A, Hakama M. Routine cervical screening with primary HPV testing and cytology triage protocol in a randomised setting. *Br J Cancer* 2005;93(8):862-67.
9. Leinonen M, Nieminen P, Kotaniemi-Talonen L et al. Age-specific evaluation of primary human papillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(23):1612-23.
10. Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2012;13(1):78-88.
11. Ronco G, Giorgi Rossi P, Carozzi F et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006;7(7):547-55.
12. Ronco G, Segnan N, Giorgi Rossi P et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(11):765-74.
13. Ronco G, Giorgi Rossi P, Carozzi F et al. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(7):492-501.
14. Ronco G, Giorgi Rossi P, Carozzi F et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2010;11(3):249-57.
15. Ronco G (ed). Health Technology Assessment – Ricerca del DNA di papillomavirus umano (HPV) come test primario per lo screening dei precursori del cancro del collo uterino. *Epidemiol Prev* 2012;36(3-4) suppl 1:1-72.
16. Documento di indirizzo sull'utilizzo del test HPV-DNA come test primario per lo screening del cancro del collo dell'utero. In: Ministero della salute, Dipartimento di sanità pubblica e dell'innovazione, Direzione generale della prevenzione. *Piano nazionale della prevenzione 2010-2012*; pp. 22-26. Diaportabile all'indirizzo: <http://www.osservatorionazionalecancer.it/sites/default/files/allegati/Screening.pdf>
17. Anttila A, Arbyn M, De Vuyst H et al (eds). *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Secondo edition – Supplements*. Lussemburgo, Publication office of the EU, 2015. Disponibile all'indirizzo: http://www.gisci.it/documenti/news/EW0115451ENN_002.pdf
18. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 2009;124(3):516-20.
19. Carozzi FM, Del Mistro A, Confortini M et al. Reproducibility of HPV DNA Testing by Hybrid Capture 2 in a Screening Setting. *Am J Clin Pathol* 2005;124(5):716-21.
20. Lorincz AT. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res* 1996;22(6):629-36.
21. Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000;283(1):87-93.
22. Ibáñez R, Féliz-Sánchez M, Godínez JM et al. Interlaboratory reproducibility and proficiency testing within the human papillomavirus cervical cancer screening program in Catalonia, Spain. *J Clin Microbiol* 2014;52(5):1511-18.
23. Castle PE, Wheeler CM, Solomon D, Schiffman M, Peyton CL; ALTS Group. Interlaboratory Reliability of Hybrid Capture 2. *Am J Clin Pathol* 2004;122(2):238-45.