



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

*Coordinatrice del Corso: Prof.ssa Margherita Maioli*

CURRICULUM IN SANITÀ PUBBLICA

XXXV ciclo

**“Extended VALHUDES”:** estensione della validazione del test  
**HPV Onclarity a nuovi dispositivi di autoprelievo**

**Tutor:**

Prof. Andrea Fausto Piana

**Dottorando:**

Dott. Fabio Bottari

**Co-Tutor:**

Prof. ssa Clementina Elvezia Cocuzza

A.A. 2022/2023

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	Pag.4
<b>1. INTRODUZIONE</b>	Pag.7
1.1 HUMAN PAPILLOMA VIRUS (HPV)	Pag.7
1.2 SCREENING TUMORE CERVICALE	Pag.9
1.3 HPV TESTS	Pag.11
1.4 VALHUDES E SELF-SAMPLING	Pag.12
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b>	Pag.19
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	Pag.21
3.1 POPOLAZIONE ARRUOLATA E CAMPIONI	Pag.21
3.2 BD VIPER LT	Pag.27
3.3 BD COR	Pag.28
3.4 ONCLARITY HPV TEST	Pag.30
3.5 ANALISI DEI DATI	Pag.32
<b>4. RISULTATI</b>	Pag.33
4.1 POPOLAZIONE	Pag.33
4.2 SENSIBILITÀ, SPECIFICITÀ E CONCORDANZA ANALITICA DEI CAMPIONI ANALIZZATI	Pag.35
4.3 VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ E DELLA SPECIFICITÀ CLINICA	Pag.38
4.4 OTTIMIZZAZIONE DEI CUT-OFF ANALITICI PER MIGLIORARE LA SPECIFICITÀ CLINICA	Pag.41
4.5 ANALISI DEI CAMPIONI DI URINA PRELEVATI CON URISPONGE	Pag.42
<b>5. DISCUSSIONE</b>	Pag.44

<b>6. CONCLUSIONE</b>	Pag.51
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	Pag.52
<b>8. RINGRAZIAMENTI</b>	Pag.60

## RIASSUNTO

**Introduzione.** Studi recenti hanno dimostrato che gli HPV test basati sulla PCR hanno un'accuratezza simile se utilizzati su campioni autoprelevati (tamponi vaginali e campione di urina) come su campioni cervicali raccolti da operatori sanitari specializzati. Tuttavia viste le diverse tipologie di dispositivi per autoprelievo in commercio e i diversi percorsi pre-analitici e analitici di ciascun test, si rende necessaria una validazione specifica dei test HPV in combinazione con i dispositivi di raccolta per autoprelievo. Questo studio, denominato Extended VALHUDES (Extended VALidation of HUman papillomavirus assays and collection DEvices for HPV testing on Self-samples), mira ad estendere una precedente validazione VALHUDES del test HPV BD Onclarity in combinazione con due dispositivi per la raccolta di campioni biologici autoprelevati: un tampone vaginale, (FLOQSwabs® 5E089N, Copan) e un dispositivo per la raccolta di un campione di urina (UriSponge, Copan). I campioni sono stati testati utilizzando due piattaforme automatizzate BD Viper™ LT e BD COR™ presenti presso il laboratorio dell'Istituto Europeo di Oncologia di Milano (IEO) e il Dipartimento di Patologia Molecolare di Hvidovre (Danimarca).

**Materiali e Metodi.** 300 donne riferite per esame colposcopico a causa di una pregressa anomalia cervicale sono state arruolate presso i due centri coinvolti nello studio (Istituto Europeo di Oncologia (IEO) e Coordinamento Consultori Familiari, ASSL Sassari, ATS Sardegna).

Un campione di urina da primo mitto e due campioni vaginali sono stati autoprelevati da ciascuna donna arruolata mediante i relativi dispositivi da autoprelievo e successivamente è stato eseguito un prelievo cervicale da personale sanitario specializzato prima dell'esame colposcopico. I campioni urinari sono stati spediti al laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca per la loro processazione e conservazione a -80°C; successivamente un'aliquota dei campioni di urina raccolti con Urisponge sono stati trasportati refrigerati al Laboratorio dello IEO per essere testati col metodo BD Onclarity sulla piattaforma BD Viper LT. I campioni vaginali sono stati spediti a secco a IEO e trasferiti in

specifiche provette (BD HPV LBC Self-Collection medium da 3ml) per la risospensione dei campioni autoprelevati. Il primo tampone raccolto è stato testato a fresco dopo risospensione con BD Onclarity su BD Viper LT presso IEO, il secondo è stato parallelamente risospeso in BD HPV LBC Self-Collection medium, immediatamente conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  e successivamente spedito refrigerato da IEO a Hvidovre in Danimarca per essere testato su entrambe le piattaforme BD Viper LT e BD COR.

Un'aliquota di 0,5ml di campione cervicale raccolto in PreservCyt (Thin Prep contenente 20ml di liquido di conservazione) dal medico è stata trasferita in una provetta contenente una soluzione diluente specifica (BD HPV LBC) e testata con BD Onclarity su BD Viper LT all'IEO ed usata come riferimento per confrontare le prestazioni.

**Risultati.** 286 delle 300 (95,3%) donne reclutate hanno avuto risultati valutabili sia dal primo autocampione vaginale prelevato che dal campione cervicale raccolto dal medico. 167 delle 286 (58,4%) donne hanno avuto biopsie cervicali durante la colposcopia, con referti istopatologici: 81 donne presentavano istologia  $\geq\text{CIN}2$  e 46 donne  $\geq\text{CIN}3$ .

La concordanza analitica complessiva tra autocampione vaginale e campione cervicale tramite analisi con il kit BD Onclarity HPV Assay su BD Viper LT eseguito presso il laboratorio IEO è risultata del 89,5% (256/286 Kappa=0,76); del 89,5% (256/286, Kappa=0,75) tramite analisi sulla piattaforma BD Viper LT eseguita presso il laboratorio di Hvidovre e del 90,2% (260/286, Kappa=0,77) utilizzando il sistema BD COR.

La sensibilità e specificità analitica del test BD Onclarity sui campioni vaginali confrontati con i risultati ottenuti dai campioni cervicali è risultata rispettivamente del 96.3% e del 76.5% dalle analisi ottenute con il sistema Viper LT presso IEO, 97.9% e 73.5% con Viper LT presso Hvidovre, 96.8% e 77.6% BD Onclarity eseguito su COR presso Hvidovre.

Per quanto riguarda la sensibilità e la specificità clinica nell'individuare lesioni CIN2+ le analisi hanno mostrato un'adeguata sensibilità relativa da tutte e tre le analisi effettuate (1.014, 1.014 e 1.000, rispettivamente dalle analisi con VIPER LT presso IEO, VIPER LT e COR a Hvidovre) ma una

bassa specificità relativa (0.831, 0.764 e 0.820, rispettivamente dalle analisi con VIPER LT presso IEO, VIPER LT e COR a Hvidovre)

È stata quindi fatta un'analisi della sensibilità e la specificità clinica del test Onclarity su Viper LT presso IEO, su Viper LT presso Hvidovre e su COR, utilizzando dei cut-off dei cicli soglia ottimizzati per i campioni autoprelevati, al fine di poter migliorare i valori di specificità del test. Utilizzando i cicli soglia ottimizzati per i campioni autoprelevati è stato possibile ottenere ottimi dati di specificità del test BD Onclarity senza perdere in sensibilità.

Non è stato possibile analizzare i dati ottenuti del test BD Onclarity dei campioni urinari autoprelevati con UriSponge in quanto il test ha rilevato più di un terzo di campioni non idonei (IC failure).

**Conclusioni.** I dati ottenuti dimostrano una buona concordanza analitica e una buona sensibilità clinica relativa tra il rilevamento dell'HPV di BD Onclarity HPV Assay eseguito sulle piattaforme VIPER LT e COR su campioni vaginali autoprelevati rispetto al campione cervicale. Aggiustando i cut-off del saggio molecolare per definire le positività per i campioni vaginali si può ottenere un ottimo bilanciamento in termini di sensibilità e specificità del test.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 HUMAN PAPILOMA VIRUS (HPV)

Nel corso degli ultimi decenni è stato chiaramente dimostrato che un'infezione persistente da HPV (Human Papilloma Virus) è la condizione necessaria, sebbene non sufficiente, per lo sviluppo di lesioni preneoplastiche cervicali (CIN) (Zur Hausen 2009).

I papillomavirus sono una grande famiglia costituita da numerosi genotipi virali: attualmente sono stati identificati e classificati più di 200 tipi di HPV: quelli a tropismo mucosale sono classificati come  $\alpha$  papillomavirus, mentre quelli a tropismo cutaneo  $\beta$  papillomavirus (De Villiers et al., 2004).

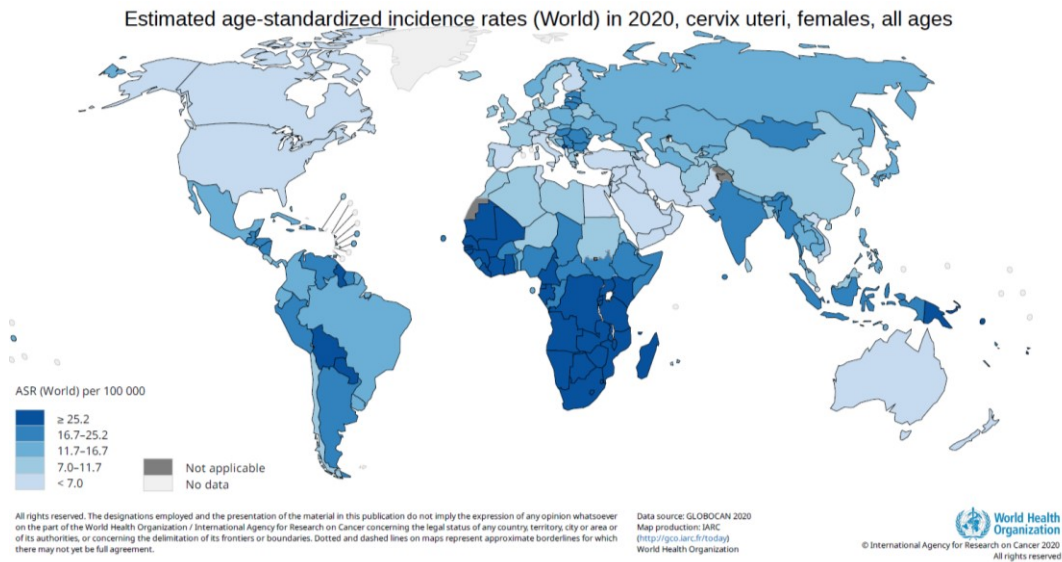
Gli HPV in grado di infettare la cervice sono stati classificati dallo IARC (International Agency for Research on Cancer) in base al loro potenziale oncogeno. Dodici sono stati classificati come ad "alto rischio" (HR): HPV16, quello con più alto potenziale oncogeno, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, e HPV59. Il 99% delle lesioni preneoplastiche cervicali si sviluppano a causa di questi HPV (Munoz et al., 2003). Gli altri genotipi a tropismo cervicale sono classificati come a "possibile/probabile rischio oncogeno" (HPV26, 53, 66, 67, 68, 70, 73, 82) e "non classificabili come cancerogeni per l'uomo" (HPV6, 11) nonostante possano causare condilomi o altre patologie benigne HPV correlate (Bouvard et al., 2009).

Annualmente la stima mondiale delle infezioni da HPV si aggira su 370 milioni di eventi l'anno, ma solo la persistenza dell'infezione può portare ad una lesione preneoplastica della cervice, quindi degenerare a tumore cervicale.

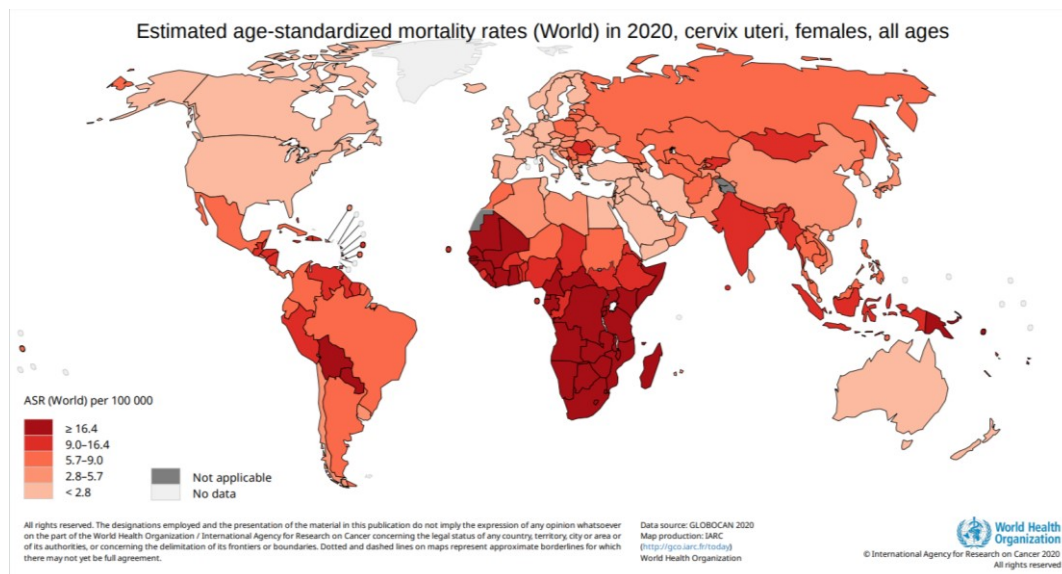
Dai dati GLOBOCAN 2020 (rapporto dell'AIRC, <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>), sul cancro cervicale nel mondo, sono stati identificati più di 604000 nuovi casi nel 2020, con la

maggior parte dei casi nei paesi in via di sviluppo, con un'incidenza media mondiale di 13.3 per 100.000 donne ed una mortalità media mondiale di 7.3 per 100.000 donne (Figure 1-2).

**Fig.1. Incidenza mondiale tumore cervice uterina (Globocan 2020)**



**Fig.2. Mortalità mondiale tumore cervice uterina (Globocan 2020)**





Recenti dati epidemiologici stimano il tumore al collo dell'utero come il quarto tumore più comune tra le donne a livello globale e circa il 90% dei nuovi casi e decessi nel mondo si sono verificati nei paesi a basso e medio reddito (Sung et al., 2021).

La genesi di una lesione preneoplastica causata da un'infezione persistente di HPV e la sua possibile progressione a tumore è un evento reversibile e che richiede anni sia nel progredire, sia nella eventuale risoluzione spontanea: infatti non tutte le infezioni persistenti da HPV progrediscono in lesioni preneoplastiche e non tutte le lesioni preneoplastiche di basso o alto grado progrediscono a tumore; una buona quota di lesioni preneoplastiche di basso grado, ed anche una parte di lesioni ad alto grado in pazienti giovani, regredisce spontaneamente (Long et al., 2007; Egawa, 2023). Se da un lato l'infezione da HPV è un evento molto frequente nella popolazione sessualmente attiva, il tumore della cervice uterina può essere considerato comunque un evento raro (Soheili et al., 2021).

## 1.2 SCREENING TUMORE CERVICALE

Dagli anni settanta lo screening per il tumore al collo dell'utero è stato fatto tramite esame citologico, il Pap Test o Test di Papanicolaou, dal nome del medico greco-americano Georgios Papanicolaou (1883-1962) e padre della citopatologia, che sviluppò questo test basato sull'analisi citologica per la diagnosi rapida dei tumori del collo dell'utero.

Nel 2013 le linee guida Europee, recepite in Italia da Documento di indirizzo del Ministero della Salute, hanno quindi sancito l'utilizzo dell'HPV Test come test primario per lo screening del tumore cervicale, lasciando alla citologia il ruolo di triage per gli HPV test positivi (Ronco et al., 2012).

L'HPV Test è un test di laboratorio basato sulla biologia molecolare che va a ricercare una quantità di DNA di HPV che correla con una lesione preneoplastica di grado 2 o superiore.

Questo perché dai dati della letteratura è emerso che la sensibilità dell'HPV Test fosse nettamente più efficace del Pap Test, che rimane invece un buon

test di triage per la sua elevata specificità (Ronco et al., 2011; Cuzick et al., 2008).

L'aggiornamento delle linee guida europee, pubblicato a Settembre 2015, e tutt'ora in essere, ha previsto l'introduzione del test HPV di screening con un protocollo assolutamente analogo a quello riportato nel documento HTA italiano: HPV primario e Pap test di triage solo nelle donne HPV positive (Von Karsa et al., 2015).

L'obiettivo dello screening non è trovare la malattia: è escludere la malattia nella popolazione generale e identificare un gruppo di persone con più alto rischio che necessitano approfondimenti.

In questo caso l'HPV test, che ha una elevata sensibilità per CIN2+, rileva lesioni preneoplastiche, che possono regredire spontaneamente, oppure progredire a tumore prima che ciò avvenga (Wright et al., 2015).

La copertura dello screening è ancora una priorità tutti i paesi, industrializzati e non, con ovviamente quote diverse da Stato a Stato.

Dai dati PASSI (Progressi delle Aziende Sanitarie per la Salute in Italia) dell'Istituto Superiore di Sanità 2017-2020 risulta che in Italia il 79% delle donne fra i 25 e i 64 anni di età si sottopone allo screening cervicale a scopo preventivo, all'interno di programmi organizzati o per iniziativa personale, secondo quanto raccomandato dalle linee guida nazionali. La quota di donne che si sottopone allo screening cervicale è maggiore fra quelle socio-economicamente più avvantaggiate (per condizioni economiche o di istruzione), fra le cittadine di nazionalità italiana rispetto alle straniere, e fra le donne coniugate o conviventi

(<https://www.epicentro.iss.it/passi/dati/ScreeningCervicale#dati>).

Gli ostacoli che si riscontrano più frequentemente per lo screening cervicale sono accessibilità e accettabilità dell'esame pelvico necessario per l'HPV test o il Pap test cervicale (Marlow et al., 2015). La mancata partecipazione allo screening o al follow-up potrebbe essere considerato uno dei maggiori fattori di rischio per il cancro del collo dell'utero nei paesi industrializzati: incoraggiando queste donne a partecipare si traduce in salvare vite e ridurre i costi di trattamento per il tumore invasivo (Benard et al., 2021).

Sono pertanto necessarie nuove strategie per aumentare l'adesione allo screening al fine di raggiungere l'obiettivo proposto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità di eliminare il tumore della cervice uterina come problematica di salute pubblica entro il 2030 (WHO, 2018).

Nei paesi in cui lo screening cervicale è basato su programmi organizzati con HPV test primario, un modo per aumentare l'aderenza ai programmi di screening cervicale è la possibilità di utilizzare campioni autoprelevati (vaginale e/o urinario) per eseguire l'HPV test, che essendo un test molecolare, non necessita in maniera imprescindibile di un prelievo cervicale da parte di personale sanitario specializzato e può essere eseguito dalla donna anche a domicilio. L'autoprelievo rappresenta quindi un'opzione molto interessante per aumentare la copertura dello screening del carcinoma della cervice uterina e raggiungere il target globale dell'OMS del 70% di copertura entro il 2030.

### 1.3 HPV TESTS

Per rilevare e seguire nel tempo le infezioni da HPV, il mercato dei kit diagnostici è progredito nel tempo, seguendo le esigenze cliniche: se nel 2010, anno in cui le evidenze scientifiche hanno dimostrato necessario passare dallo screening basato su PAP Test a quello basato su HPV Test come test primario, esistevano circa 70 saggi per la ricerca di HPV, nel 2020 i test commercializzati erano 253, che risulta un aumento di più di 3,5 volte in dieci anni (Poljack et al., 2020).

I test HPV hanno seguito inoltre l'evoluzione della biologia molecolare: mentre la prima generazione di saggi era complicata e dispendiosa, basata essenzialmente su saggi tipo Southern Blot, i test attualmente più diffusi in commercio si basano su tecniche di Real Time PCR. Nel mezzo ci sono stati dei saggi di biologia molecolare non basati su PCR, ma sull'amplificazione del segnale della presenza di HPV, che hanno avuto una grandissima efficacia e larghissima diffusione (Hybrid Capture2, HC2 e Cervista), che tutt'oggi vengono considerati Gold standard e dal cui confronto di performance è possibile eseguire studi di validazione di nuove

metodiche. Mentre i primi test erano poco automatizzati e richiedevano molto tempo per la loro esecuzione, i test HPV di ultima generazione hanno raggiunto un elevato grado di automazione: questi test sono in grado di rilevare la presenza di HR HPV in poche ore e di fornire, in caso di positività, ulteriori informazioni, come ad esempio il genotipo o la carica virale.

Sebbene sul mercato esistano centinaia di HPV Test, pochi di essi sono validati per lo screening. I test validati per lo screening secondo le linee guida di Meijer (Meijer et al., 2009) o secondo il protocollo VALGENT (Arbyn et al., 2016) nello screening sono attualmente una piccola percentuale del totale, rispettivamente il 5 e l'8% del totale.

La validazione e l'utilizzo nella pratica clinica di HPV Test validati è fondamentale, in quanto è necessario conoscere le performance di un test. L'end-point clinico di questi test validati è settato al CIN di grado 2 o superiore, assicurando così un idoneo grado di sensibilità e evitando sovradiagnosi di infezioni che potrebbero essere transienti e non correlate allo sviluppo di una lesione preneoplastica.

Infine gli HPV test non vengono utilizzati solo nel setting dello screening, ma anche per il follow-up delle pazienti positive che hanno comunque una citologia negativa e nel follow-up post trattamento chirurgico.

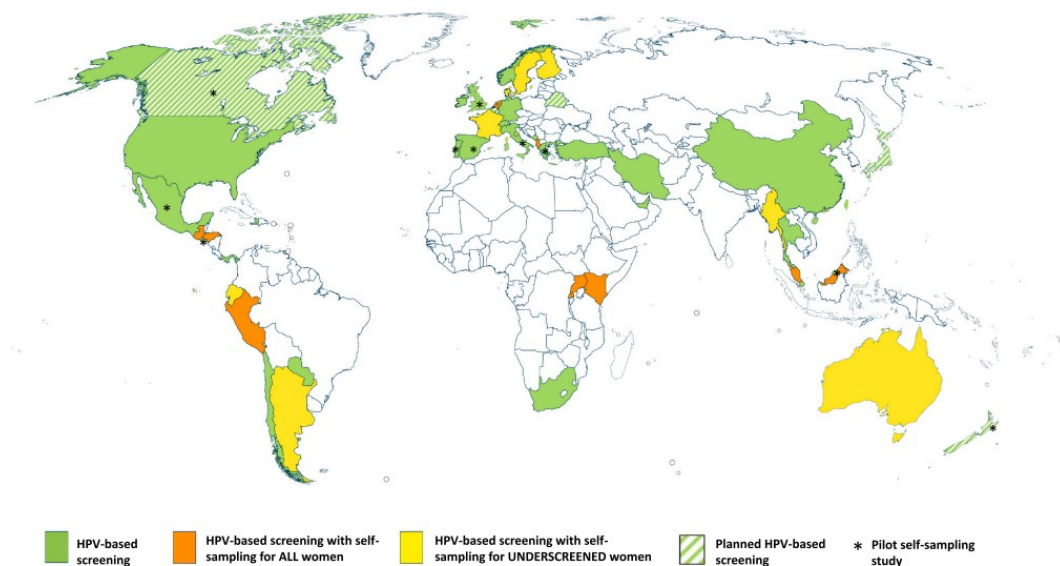
## 1.4 VALHUDES E SELF-SAMPLING

L'aderenza ai programmi di screening è fondamentale, ma non sempre semplice da raggiungere: diversi studi hanno mostrato che spedire un kit di autocampionamento all'indirizzo di casa delle donne genera una risposta maggiore rispetto all'invio di lettere di sollecito per raccomandare il prelievo di un campione cervicale da parte di un operatore sanitario. L'offerta di dispositivi che consentono alle donne di autoprelevare un campione da analizzare può quindi aumentare l'aderenza allo screening del tumore cervicale, soprattutto per quelle donne che non partecipano regolarmente al programma (Verdoodt et al., 2015).

I principali ostacoli all'adesione allo screening riguardano precedenti esperienze negative dell'utente (disagio o dolore durante una visita specialistica); sentimenti di imbarazzo e vergogna (Marlow et al., 2015).

Per aumentare l'adesione ai programmi di screening, la maggior parte dei paesi industrializzati hanno ampliato i programmi di screening per la prevenzione de tumore alla cervice uterina, introducendo la metodica dell'autoprelievo (self-sampling) con l'obiettivo di raggiungere un maggior numero di donne.

Da un censimento fatto da Serrano e collaboratori, nel 2021 raccomandazioni ufficiali per lo screening del cancro cervicale sono state identificate in 139 (69%) nazioni. Fino a febbraio 2021, 48 (24%) paesi hanno raccomandato lo screening primario basato sull'HPV test; tra i 48 paesi con programmi basati sull'HPV test, 17 (35%) riferiscono di aver introdotto l'autocampionamento nei loro programmi o linee guida nazionali (Serrano et al., 2021) per uno screening indirizzato a tutte le donne eleggibili o dedicato alle non-responder come indicato nella Figura 3.



**Figura 3. Approccio di autocampionamento nei paesi che raccomandano ufficialmente lo screening basato sull'HPV test**

L'Autoprelievo è una metodica che consente alle donne di raccogliere in modo autonomo, semplice e affidabile il campione necessario per effettuare i test di screening; è stato studiato per essere accettabile dalle utenti e di facile utilizzo, in modo da poterlo utilizzare con minime istruzioni. Rappresenta un metodo conveniente ed economico, ma soprattutto, un ulteriore strategia per raggiungere le donne che non partecipano al regolare programma di screening (Mao et al., 2017).

Caratteristiche principali dei dispositivi per autoprelievo sono praticità, semplicità di utilizzo e sicurezza per la paziente. I dispositivi per autoprelievo vaginale infatti, vanno a campionare il materiale biologico il più vicino possibile alla cervice, dove è maggiore la possibilità di identificare genotipi di HPV e ridurre al minimo l'errore, ma in tutta sicurezza, visto che questo prelievo viene eseguito da personale non specializzato.

Anche i dispositivi urinari sono stati pensati per essere semplici, non invasivi e sicuri: sono realizzati per raccogliere urine di primo mitto, perché in questo campione è stato riscontrato trovare un maggior numero di cellule, per raccogliere una quantità idonea ad eseguire l'estrazione del DNA virale e spesso contengono un conservante per ridurre al minimo la possibilità di contaminanti o inibenti la reazione di PCR (Vosters et al., 2014).

Nel 2018 Arbyn e collaboratori hanno effettuato una metanalisi per valutare l'accuratezza diagnostica dell'HPV test su campioni autoprelevati e l'efficacia delle strategie di autocampionamento nel raggiungere donne che normalmente non aderiscono ai programmi di screening (Arbyn et al., 2018). In questa metanalisi sono stati inclusi 56 studi di accuratezza e 25 trials: i dati ottenuti hanno permesso di stabilire che gli HPV test basati sulla PCR hanno mostrato una sensibilità paragonabile su campioni autoprelevati rispetto a campioni prelevati da personale sanitario specializzato nel rilevare CIN2+ o CIN3+ (raggruppati rapporto 0,99, intervallo di confidenza al 95% da 0,97 a 1,02), mentre HPV tests basati sull'amplificazione del segnale sono meno sensibili sui campioni autoprelevati rispetto a quelli prelevati da personale sanitario specializzato (rapporto aggregato 0,85, intervallo di confidenza al 95% da 0,80 a 0,89).

La specificità per CIN2+ era del 2% e del 4% inferiore sui campioni autoprelevati rispetto ai campioni prelevati dai clinici, per gli HPV test basati sulla PCR e sull'amplificazione del segnale, rispettivamente.

Inoltre ha evidenziato che l'invio dei kit di autocampionamento alla donna all'indirizzo di casa ha generato tassi di risposta più elevati rispetto all'invito a recarsi in un ambulatorio per prelevare un campione da un clinico o a lettere di sollecito.

Se da un lato questa revisione ha concluso che gli HPV test basati sulla PCR risultano accurati su campioni vaginali autoprelevati come su campioni prelevati dal clinico nell'individuare lesioni preneoplastiche di grado due o superiori, dall'altro mostrava come non fossero disponibili prove sufficienti per specifiche combinazioni di HPV test/dispositivo di autocampionamento. VALHUDES, acronimo di VALidation of HUman papillomavirus assays and collection DEvices for HPV testing on Self-samples è un protocollo proposto da Marc Arbyn e collaboratori per la validazione dei dispositivi di raccolta per i test HPV su campioni autoprelevati (Arbyn et al., 2018).

La peculiarità di questo protocollo è che è stato creato al fine di validare la combinazione HPV Test e dispositivo di prelievo, per valutare le performance di un preciso HPV test basato sulle metodiche di amplificazione degli acidi nucleici mediante Real Time PCR su campioni vaginali e/o urinari autoprelevati secondo protocolli standardizzati.

Per validare la combinazione HPV Test e dispositivo di autoprelievo i risultati dei campioni autoprelevati vengono confrontati con quelli prelevati da personale sanitario specializzato, che sono considerati come gold standard di riferimento.

L'obiettivo principale del protocollo VALHUDES è quindi valutare se un preciso HPV test di un campione vaginale o di urina di prima minzione effettuato dalla donna stessa, prelevato con uno specifico dispositivo per autocampionamento, è accurato nel rilevare un CIN di grado 2 o superiore quanto lo stesso HPV test, precedentemente validato secondo i criteri internazionali per lo screening per la prevenzione del carcinoma della cervice uterina, effettuato su campione cervicale prelevato da un operatore

sanitario (esito di riferimento). In particolar modo viene valutata la sensibilità e specificità clinica dell'HPV test dell'autoprelievo relativa a quella ottenuta da campione cervicale prelevato da un operatore sanitario.

Gli obiettivi secondari includono la concordanza analitica tra lo specifico HPV test effettuato da campioni ottenuti tramite autoprelievo a confronto con il campione cervicale, sia in termini di positività in generale ad HR-HPV sia la concordanza genotipo-specifica se previsto dallo specifico HPV test. Inoltre può essere valutata la proporzione di campioni adeguati come determinato dall'amplificazione di un controllo interno (un gene umano presente in tutte le cellule, come ad esempio la Beta globina).

Per fare ciò, e assumendo di avere una popolazione con elevata probabilità di avere una positività all'HPV associata a lesioni preneoplastiche, come ad esempio donne inviate a colposcopia, il protocollo prevede l'arruolamento di almeno 500 donne, alle quali si chiederà di fare l'autoprelievo prima che le sia fatto un prelievo da parte dell'operatore sanitario.

Altra peculiarità del protocollo VALHUDES è l'utilizzo di metodi precedentemente validati sul campione cervicale secondo le linee guida di Meijer et al. o VALGENT e basati su test di amplificazione degli acidi nucleici eseguiti in idonei laboratori accreditati.

Il primo studio basato sul protocollo VALHUDES prende il nome di Belgian VALHUDES, in quanto condotto in Belgio e ha validato i seguenti dispositivi di autoprelievo e HPV tests:

- dispositivi di autoprelievo: Colli-Pee device (Novosanis NV, Wijnegem, Belgio) per i campioni di urina, Multi-Collect Swab (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL, USA), Evalyn Brush (Rovers Medical Devices, Paesi Bassi) e Qvintip (Aprovix AB, Uppsala, Svezia) per i campioni vaginali, risospesi in 20 mL di ThinPrep/PreservCyt.
- HPV tests: Abbott RealTime High Risk HPV assay (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL, USA), cobas 4800 e 6800 (validati solo da campione di urina (Roche Molecular System, Pleasanton, CF, USA)) e RIATOL qPCR HPV genotyping assay (Depuydt et al., 2012).



Una seconda parte del Belgian VALHUDES ha quindi utilizzato materiale aliquotato e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  prelevato con gli stessi dispositivi di autoprelievo della prima parte del Belgian VALHUDES con altri HPV tests: Onclarity HPV Assay (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA), Xpert HPV Assay (Cepheid, Sunnyvale, USA), e Anyplex II HPV HR (Seegene, Seoul, Korea del Sud).

Dai dati ottenuti dal Belgian VALHUDES si è concluso che la sensibilità relativa e la specificità dei test HPV su campioni urinari o vaginali autoprelevati, trasportati a secco e risospesi in 20 mL di ThinPrep/PreservCyt rispetto ai campioni raccolti da operatori sanitari specializzati erano del tutto simili dimostrando così la validità del campione autoprelevato.

In particolare, per Onclarity la sensibilità per CIN di grado 2 o superiore sui campioni vaginali autoprelevati non era diversa dai campioni cervicali raccolti dal medico (rapporto = 0,96; 95% CI, 0,90-1,03), mentre la specificità era significativamente più alta (rapporto = 1,09; 95% CI, 1,02-1,16). Inoltre, l'accuratezza relativa (autocampionamento vs. prelievo raccolto dal clinico) differiva in base al dispositivo di raccolta vaginale: rapporti di sensibilità e specificità relativi di 1,00 (95% CI, 0,94-1,06) e 1,15 (95% CI, 1,05-1,25), rispettivamente per Evalyn-brush; 0,91 (95% CI, 0,79-1,04) e 1,03 (95% CI, 0,95-1,13), rispettivamente per Qvintip (Latsuzbaia et al., 2023).

Il test Onclarity eseguito su campioni di urina di prima minzione era ugualmente sensibile sia per CIN di grado 2 o superiore (rapporto 1,00; 95% CI: 0,93-1,07) e lievemente meno specifico per CIN di grado 2 (rapporto 0,92; IC 95%: 0,84-0,996) rispetto ai campioni cervicali prelevati dall'operatore sanitario specializzato. La concordanza del test HPV tra le coppie di campioni espresse come Kappa di Cohen è risultata essere da moderata a eccellente per Onclarity, sia overall che per i singoli genotipi ( $\kappa=0,56-0,85$ ) (Van Keer et al., 2022).

Nell'articolo stesso del 2018 dove veniva illustrato il protocollo di validazione VALHUDES, Marc Arbyn e collaboratori stessi esortavano ad estendere la

validazione ad altri dispositivi di autoprelievo urinari e vaginali e ad altri HPV test utilizzando i criteri del protocollo VALHUDES, con la condizione che i test HPV impiegati soddisfino i requisiti internazionali di validazione per l'uso su campioni cervicali prelevati dal medico (Linee guida di Meijer et al. o protocollo VALGENT).

Inoltre il recente lavoro di Arbyn e collaboratori sottolinea l'importanza di tutto il percorso preanalitico nella validazione degli HPV test basati su RT-PCR su campioni ottenuti tramite autoprelievo (Arbyn et al., 2023).

Conoscere le performance del test può essere utile per ottimizzare il test su campioni extracervicali: questi test infatti sono stati concepiti per rilevare il CIN2+ su campioni cervicali, ma non se ne conoscono le performance per altri tipi di campione (Arbyn et al., 2021). La diluizione del campione autoprelevato è un fattore da tenere in considerazione: da una parte, i campioni vaginali vengono raccolti dalla vagina dove la concentrazione di cellule infette da HPV è inferiore (Belinson et al., 2010), e dove verosimilmente possiamo trovare un numero maggiore di infezioni da HPV clinicamente non rilevanti, dall'altra sospendere il tampone vaginale in 2 ml, invece di 20 ml può generare un aumento di 10 volte della concentrazione e potrebbe generare segnali positivi circa 3 cicli prima. Un tale aumento della concentrazione potrebbe migliorare la sensibilità a discapito della specificità.

Validare e quindi conoscere le performance di un HPV test su campioni autoprelevati è fondamentale sia per il laboratorio che esegue il test, sia per il clinico, il quale richiede, anche in questo caso, come negli HPV test eseguiti su campioni cervicali, come requisito fondamentale quello di individuare il maggior numero di lesioni preneoplastiche di grado 2 o superiore ed evitare le infezioni transienti o irrilevanti che non correlano con lesioni preneoplastiche.

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

Questo studio, denominato “Extended VALHUDES”, si propone di estendere la validazione del test BD Onclarity eseguito sulle piattaforme Viper LT e COR al dispositivo per autoprelievo vaginale FLOQSwab (FLOQSwab® 5E089N) e al dispositivo per la raccolta di urina da primo mitto UriSponge (UriSponge™ 8E031S100) sviluppati e commercializzati da Copan (Copan, Brescia, Italia).

Come il precedente Belgian VALHUDES, Extended VALHUDES è l’acronimo di Validation of human papillomavirus assays and collection devices for HPV testing on self-samples and first-void urine samples, ma è extended, perché è l’estensione a nuovi dispositivi di autoprelievo e HPV test ed a nuove piattaforme automatizzate per il processamento dei campioni

Lo scopo dello studio era quindi di estendere la validazione di BD Onclarity in combinazione a nuovi dispositivi di autoprelievo e a nuove piattaforme automatizzate per il processamento dei campioni.

L’estensione della validazione di FLOQSwab e UriSponge eseguiti con BD Onclarity su BD Viper LT e BD COR permetterà di poter utilizzare il test Onclarity con questi dispositivi di autoprelievo nello screening del carcinoma cervicale basato su HPV test garantendo un’accuratezza nel rilevare CIN di grado 2 o superiore con un HPV test validato simile a quello di un campione raccolto dal personale sanitario specializzato.

Al fine di estendere la validazione del test ai nuovi dispositivi di prelievo lo studio si è posto i seguenti obiettivi:

- Valutare la concordanza analitica delle positività per HPV (positive percentage agreement, PPA) di tamponi vaginali ed urinari raccolti mediante autoprelievo rispetto ai campioni citologici cervicali raccolti dal medico.
- Valutare la sensibilità e la specificità analitica del test HPV su campioni di autoprelevati rispetto a quelli cervicali prelevati da operatori sanitari specializzati.

- Valutare la sensibilità e la specificità clinica del test HPV per l'identificazione di alterazioni precancerose cervicali di alto grado su campioni vaginali autoprelevati e campioni cervicali prelevati da un operatore sanitario specializzato.
- Valutare di adattare i cicli soglia della RT\_PCR per i campioni ottenuti da autoprelievo quali cut-off di positività per i diversi HR HPV da rispetto a quelli preimpostati che sono specifici per i campioni cervicali.

A tal fine, sono state arruolate 300 donne afferenti a due centri di colposcopia italiani: l'Istituto Europeo di Oncologia (IEO) di Milano e il Coordinamento Consultori Familiari dell'ASSL Sassari in Sardegna.

A queste donne è stato chiesto di prelevare un campione di urina da primo mitto, due campioni vaginali con dispositivo di autoprelievo FLOQSwab ed in seguito è stato fatto loro il prelievo cervicale da parte del clinico.

Questi campioni sono stati testati con il test BD Onclarity sulle piattaforme BD Viper LT presso la Divisione di Medicina di Laboratorio dello IEO e con la piattaforma BD Viper LT e BD COR presso il laboratorio di Patologia Molecolare di Hvidovre in Danimarca per valutarne le performance.

Infine sono state inviate delle aliquote di campione presso il Laboratorio di Microbiologia Clinica e Virologia dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca (UNIMIB) per essere biobancate. L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata eseguita dall'Unità di Epidemiologia dei Tumori del Belgio (Sciensano).

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 POPOLAZIONE ARRUOLATA E CAMPIONI

Sono stati individuati due centri per il reclutamento delle 300 donne: l'Istituto Europeo di Oncologia (IEO) di Milano e l'U.O. Coordinamento Consultori Familiari dell'ASSL di Sassari.

A tutte le donne arruolate è stato presentato lo studio ed è stata richiesta la firma per il consenso informato per la partecipazione. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'ATS Sardegna in data 21 Luglio 2020 e dal Comitato Etico IEO in data 16 Settembre 2020 e registrato con il numero IEO1368.

Il protocollo prevedeva che ciascuna donna raccogliesse innanzitutto un campione di urina primo mitto in un barattolo per la raccolta di campioni urinari (figura 4).



**Figura 4. Barattolo sterile per raccolta urine di primo mitto**

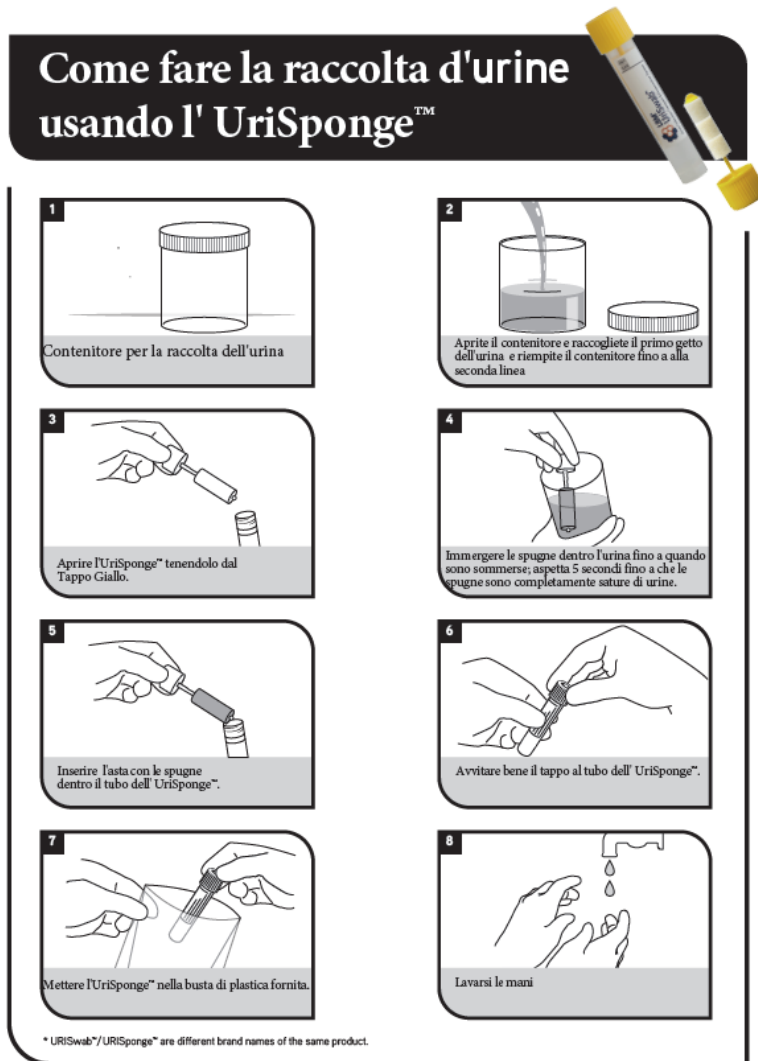
Successivamente, la donna immergeva un dispositivo UriSponge™ nell'urina appena raccolta. Questo UriSponge™ veniva contrassegnato come autoraccolto. Il volume residuo di urina nel contenitore per urina insieme all'UriSponge™ autoraccolto veniva consegnato dalla donna ad un operatore sanitario per essere successivamente trasferito al laboratorio locale dove con l'urina residua venivano preparati altri 3 dispositivi UriSponge™ contrassegnati come preparati dal laboratorio.

Il dispositivo di raccolta UriSponge™ combina un tubo di plastica e un tappo a vite con spugne imbevute di conservanti urinari di acido borico e formiato di sodio.



**Figura 5. Dispositivo Copan Urisponge per autoraccolta di urine di primo mitto**

Il campione viene semplicemente preparato immergendo momentaneamente la spugna nel campione di urina. Il dispositivo imbevuto può essere quindi spedito al laboratorio che centrifugando il campione raccoglie l'urina e le cellule in essa contenute: il materiale biologico adesivo nelle spugne del dispositivo viene infatti rilasciato in soluzione tramite centrifugazione. Le istruzioni per l'uso sono riassunte in Figura 6.



All images and trademarks are property of Copan Italia S.p.A. For Investigational and Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

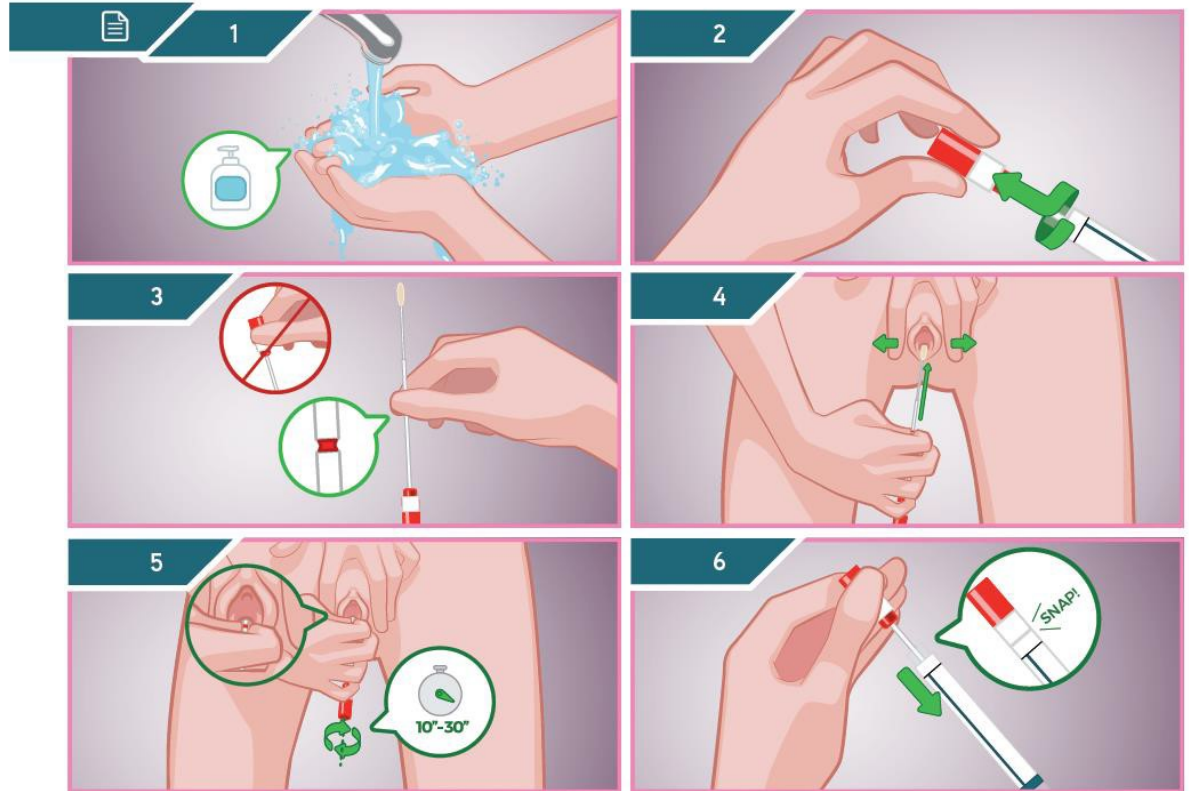
**Figura 6. Istruzione per l'uso del dispositivo Copan UriSponge**

Oltre al campione di urina, prima della colposcopia a ciascuna donna veniva chiesto di raccogliere due tamponi vaginali usando il tampone vaginale FLOQSwab®, etichettati come primo e secondo prelievo. Il tampone FLOQSwabs, mostrato in figura 7, è un tampone di semplice struttura, costituito da un'asta di plastica con all'apice la porzione cotonata.



**Figura 7. Dispositivo per autoprelievo vaginale Copan FLOQSwab**

Le istruzioni per autoprelievo vaginale sono semplici ed intuitive e sono riassunte in figura 8.



HPI031A Rev.01 Date 2019.06

**Figura 8. Istruzione per l'uso del dispositivo Copan FLOQSwab**

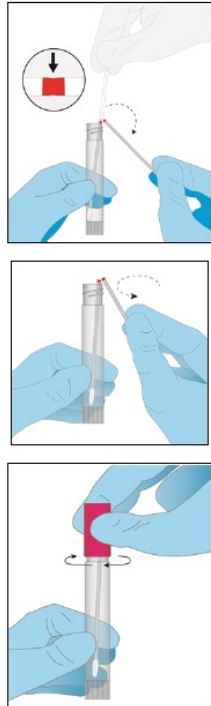
Il tampone secco veniva riposto nel proprio involucro e non necessitava di terreno o liquido per il trasporto e la conservazione.

Copan infatti ha sviluppato per questo protocollo un tampone floccato FLOQSwab a secco che avesse la particolarità di avere un punto di rottura preciso (segno rosso sull'asta del tampone) in prossimità della parte apicale della provetta LBC BD (FLOQSwab® 5E089N).

In tal modo il campione vaginale autoprelevato può viaggiare a temperatura ambiente; dopo la raccolta, i campioni possono essere conservati fino a 30 giorni a -20°C o in un range di temperatura che va da 2°C a 30°C. Il tampone poi può essere stemperato direttamente nel tubo da caricare sullo strumento, rompendolo nella provetta e lasciandolo lì fino all'esecuzione del test come mostrato in figura 9. I campioni nella BD Onclarity HPV Self Collection Diluent



Tube così preparati possono essere conservati fino a 15 giorni a -20 °C o 2 °C–30 °C prima dell'esecuzione del test con il BD Onclarity HPV Assay.



**Figura 9. Trasferimento del tampone vaginale Copan FLOQSwab nella provetta BD Onclarity HPV Self Collection Diluent Tube**

Il Viper LT infatti è in grado, quando buca con il puntale sterile il tappo del tubo LBC, di spostare il bastoncino del tampone di lato e prelevare la quantità di campione necessaria all'estrazione del DNA.

Dopo questa fase di autoprelievo fatta dalla donna, il/la ginecologo/a prelevava un campione cervicale mediante brush eso- ed endocervicale (Cervex-Brush, Rovers) e posto in 20 ml mezzo di conservazione per citologia a base liquida (LBC) PreservCyt (Hologic) prima della colposcopia (figura 10).



**Figura 10. Dispositivo per conservazione per citologia a base liquida PreservCyt**

L'esperienza dell'utilizzo dei due dispositivi di autoprelievo veniva quindi valutata dalla donna tramite due brevi questionari di gradimento.

I campioni provenienti dal Consultorio dell'ASSL di Sassari etichettati con un identificativo univoco venivano quindi inviati al Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Sperimentali dell'Università degli Studi di Sassari che provvedeva settimanalmente alla spedizione dei campioni alla Divisione di Medicina di Laboratorio dello IEO.

I campioni di urina raccolti con UriSponge sono stati etichettati con un identificativo univoco e inviati settimanalmente al Laboratorio di Microbiologia clinica e virologia dell'Università di Milano-Bicocca (UNIMIB) dove sono stati centrifugati, aliquotati e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Un campione di urina autoprelevato con UriSponge è stato quindi testato col test BD Onclarity su BD Viper LT presso il laboratorio IEO.

All'arrivo presso il laboratorio dello IEO, entrambi i dispositivi vaginali raccolti da ciascuna donna arruolata sono stati trasferiti nelle provette contenente il diluente HPV Self-Collect Diluent Tube (tappo grigio contenenti 3 mL di liquido), non più di 7-10 giorni dalla data del prelievo del campione.

Inoltre, un'aliquota del campione cervicale (500  $\mu\text{l}$ ) di PreservCyt dopo essere stata risospesa col vortex per 15 secondi è stata trasferita in una provetta diluente BD HPV LBC (tappo nero, figura 11) contenente 1,6 mL di liquido.



**Figura 11. Diluente BD HPV LBC**

Il primo tampone vaginale raccolto e il campione cervicale sono stati quindi analizzati con il test HPV Onclarity di BD sulla piattaforma automatizzata BD Viper LT presente in IEO. Il secondo tampone vaginale risospeso nella provetta del diluente è stato conservato a -20°C e inviato congelato per i test HPV Onclarity sui sistemi BD COR e BD Viper LT disponibili presso il laboratorio di Patologia Molecolare di Hvidovre a Copenaghen in Danimarca.

Il materiale LBC cervicale residuo è stato poi aliquotato e conservato a -80°C per futuri test. Tutti i campioni residui sono conservati presso il Laboratorio di Microbiologia Clinica e Virologia di UNIMIB

### 3.2 BD VIPER LT



**Figura 12. La piattaforma BD Viper LT per l'esecuzione del test BD Onclarity**

Con la piattaforma BD Viper LT è stato possibile testare 30 campioni a seduta ma non è stato possibile fare sedute di campioni cervicali e vaginali contemporaneamente in quanto le sedute prevedono la scelta dal menu del tipo di campione da analizzare. Le fasi di programmazione e caricamento dello strumento per i campioni e reagenti sono guidati dal software.

È prevista una fase di pre-warm che avviene al di fuori dello strumento e dura circa un'ora e permette al campione di essere denaturato al fine di eseguire una estrazione del DNA più efficiente (solo per i campioni cervicali). Successivamente il rack contenente 30 campioni e 2 controlli (un positivo e un negativo) viene caricato sullo strumento (figura 12) che automaticamente provvede ad estrazione, setup della piastra per Real Time-PCR ed esecuzione della reazione di RT-PCR.

Al termine della seduta i risultati vengono automaticamente rilasciati dallo strumento e stampati su un apposito report.

### 3.3 BD COR

Il sistema BD COR (figura 13) è una strumentazione analitica più complessa rispetto al Viper LT, dotata di un modulo di preanalitica ed in grado di processare un numero notevolmente maggiore di campioni e di essere caricata in continuo.



**Figura 13. La piattaforma BD COR per l'esecuzione del test BD Onclarity**

Ha il vantaggio di essere caricato tramite rack, minimizzando così la manipolazione dei campioni.

Ha una cadenza analitica notevolmente più performante rispetto a Viper LT: è in grado infatti di analizzare fino a 330 campioni di HPV test in 8 ore. Inoltre alla versione con un modulo per biologia molecolare è possibile abbinare un secondo modulo ed ottenere così una processività di 660 risultati in 8 ore.

Il modulo di preanalitica è in grado di lavorare campioni primari ancora tappati di SurePath e PreservCyt oltre alle fiale BD LBC.

Il modulo di preanalitica di COR è in grado di agitare automaticamente i campioni mediante vortex, stappare i barattoli, aliquotare e ritappare i tubi primari; eseguire tutte le fasi di preriscaldamento e raffreddamento necessarie e caricare completamente lo strumento per il test in meno di 15 minuti.

Il modulo analitico, BD COR GX automatizza il test di genotipizzazione estesa in RT-PCR BD Onclarity, esegue quindi il medesimo test di Viper LT ma in una piattaforma totalmente automatizzata.

Al termine della seduta i risultati vengono automaticamente rilasciati dallo strumento e stampati su un apposito report.

### 3.4 ONCLARITY HPV TEST

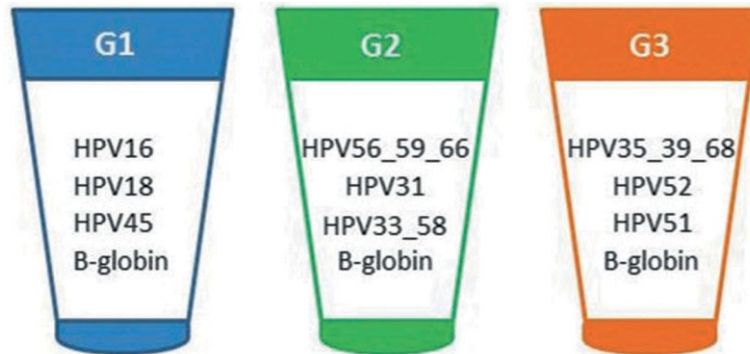
Becton Dickinson (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA) Onclarity HPV Assay è un HPV test qualitativo basato sull'amplificazione del target basato sulla tecnologia RT-PCR e sonda fluorescente che permette di rilevare regioni del DNA dei geni E6 e E7 del genoma dell'HPV. Esso può essere eseguito sulla piattaforma semiautomatizzata BD Viper LT o sulla piattaforma totalmente automatizzata BD COR. Il test rileva simultaneamente 12 genotipi HPV ad alto rischio e due possibilmente/probabilmente cancerogeni (HPV66, HPV68); Onclarity fornisce simultaneamente oltre al dato qualitativo di negatività o positività informazioni sulla genotipizzazione: sei genotipi vengono ricercati individualmente (HPV 16, 18, 31, 45, 51 e 52) mentre i restanti genotipi di HPV sono rilevati e riportati in tre gruppi distinti (33/58, 35/39/68 e 56/59/66). Il test ricerca inoltre il gene della beta-globina umana (HBB), come controllo interno per l'adeguatezza del campione e le prestazioni del test.

Il test utilizza 0,5 ml di campione per citologia in fase liquida (ThinPrep o SupePath) che viene aggiunto ad una idonea soluzione prodotta da BD (il tubo LBC) per raggiungere un volume finale di 2,2 ml di cui 0,8 ml di campione vengono prelevati automaticamente dallo strumento per eseguire l'estrazione degli acidi nucleici mediante la chimica di estrazione sviluppata da BD e nota come BD FOX™.

Per i tamponi vaginali lo strumento procede direttamente all'estrazione degli acidi nucleici prelevando 0,8 ml di campione dei 3 ml di HPV Self Collect Diluent in cui è stato risospeso il tampone vaginale secco.

Il DNA estratto viene quindi eluito in un volume finale di 400 microlitri e 50 microlitri pipettati automaticamente in ciascuno dei tre pozzetti contenenti la master-mix liofilizzata, che viene quindi reidratata dall'eluato, prima della sigillatura automatica delle piastre e della reazione di amplificazione RT-PCR. Il DNA estratto viene suddiviso in tre provette di reazione per RT-PCR colorate diversamente (blu, verde e arancione). Nella provetta blu per PCR ci sono le sonde per HPV16, HPV18, HPV45 e  $\beta$ -globina, nella provetta da

PCR verde le sonde per rilevamento di HPV 31, HPV33/58, HPV 56/59/66 e  $\beta$ -globina e nelle provette per PCR arancioni le sonde per HPV51, HPV52, HPV 35/39/68 e  $\beta$ -globina come rappresentato in Figura 14.



**Figura 14. Schema delle sonde di genotipizzazione nei tre pozzetti per RT-PCR del test BD Onclarity**

Un controllo positivo ed un controllo negativo vengono aggiunti ad ogni seduta come controlli di validità dei risultati.

Il cut-off clinico è impostato per essere correlato alla malattia CIN2+ e l'algoritmo verifica l'adeguatezza del campione utilizzando l'amplificazione del gene della beta-globina umana.

In particolare, il software interpreta le curve di amplificazione sulla base dei seguenti cicli soglia (Ct) validati sul campione cervicale:

- HPV16:
  - positivo:  $Ct \leq 38,3$
  - negativo:  $Ct > 38,3$
- tutti gli altri HPV ad alto rischio:
  - positivo:  $Ct \leq 34,2$
  - negativo:  $Ct > 34,2$
- gene del controllo interno (beta-globina umana):
  - positivo:  $Ct \leq 34,2$
  - negativo:  $Ct > 34,2$

### 3.5 ANALISI DEI DATI

L'analisi statistica di tutti i risultati dello studio è stata valutata presso l'Unità di Epidemiologia dei Tumori (Belgian Cancer Center, Sciensano) a Bruxelles. In particolare, l'età della popolazione è stata valutata mediante analisi della media e relativo range; il grado di concordanza è stato valutato mediante il test della  $k$  di Cohen (con i seguenti gradi: se  $k$  assume valori inferiori a 0, allora non c'è concordanza; se  $k$  assume valori compresi tra 0-0,4, allora la concordanza è scarsa; se  $k$  assume valori compresi tra 0,4-0,6, allora la concordanza è moderata; se  $k$  assume valori compresi tra 0,6-0,8, la concordanza è buona; se  $k$  assume valori compresi tra 0,8-1, la concordanza è ottima). Sono state calcolate la sensibilità e specificità analitica ed i relativi intervalli di confidenza al 95% sia in generale che genotipo specifica; è stata infine calcolata sensibilità e specificità clinica relativa, tenendo come riferimento il test BD Onclarity eseguito su campione cervicale. La significatività statistica è stata valutata con il test di McNemar.



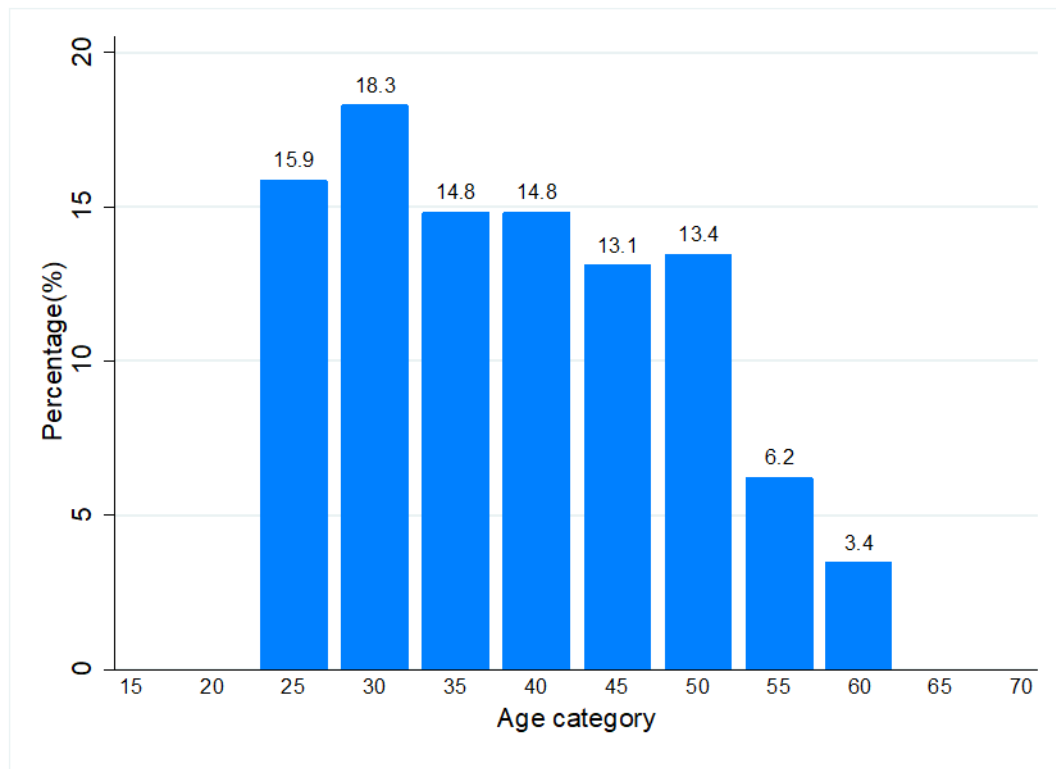
## 4 RISULTATI

### 4.1 POPOLAZIONE

Per lo studio Extended VALHUDES sono state reclutate 300 pazienti tra il 08/03/2021 e il 14/07/2021. Dieci pazienti sono stati escluse a causa dell'inadeguatezza del test di riferimento (l'esame biotipico è risultato insoddisfacente), un campione è stato escluso a causa dell'inadeguatezza del campione cervicale, mentre per quanto riguarda i campioni vaginali sono stati esclusi dall'analisi tre campioni vaginali per i quali non è stato possibile avere un risultato con Viper LT presso IEO e presso Hvidovre e un campione per quelli eseguiti su COR, per un totale rispettivamente di 286, e 288 campioni analizzabili. In tabella 1 sono riportati i numeri dei campioni analizzati con un risultato valido.

**Tabella 1:** Numero di HPV Test validi.

Risultati Onclarity	Cervicale	Primo Vaginale	Secondo Vaginale VIPER	Secondo Vaginale COR
Cervicale	289			
Primo vaginale	286	287		
Secondo vaginale VIPER	286	285	287	
Secondo vaginale COR	288	287	287	289



**Figura 15. Distribuzione dell'età delle pazienti arruolate (scala di cinque anni)**

L'età media delle donne arruolate allo studio era di 40 anni con un range tra i 25 e i 64 anni come schematizzato in figura 15.

Il 58% delle pazienti è stato sottoposto a biopsia (167/289). Il 56% delle pazienti sottoposte a biopsia presentava impressione colposcopica di basso grado (93/167). 64 pazienti su 167 (38%) presentavano reperti colposcopici sospetti maggiori e 8 pazienti su 167 (5%) non mostravano reperti sospetti durante la colposcopia, ma sono state sottoposte a biopsia. Per due pazienti, c'era il sospetto di tumore.

Tra i 123 pazienti non sottoposti a biopsia, la colposcopia non ha mostrato risultati sospetti in 96 (96/123, 78%). Per 27/123 (22%) pazienti sono stati riportati impressioni colposcopiche di basso grado. Nessun paziente senza biopsia ha avuto risultati sospetti maggiori o sospetto di cancro alla colposcopia.

Sono stati riscontrati i seguenti esiti istologici: 54 negativi, 46 CIN1, 35 CIN2, 43 CIN3 e 3 carcinomi. In questa popolazione è stato riscontrato un

tasso di CIN2+ del 28% (81/289). Tutti i dati clinici sono riassunti in tabella 2.

**Tabella 2.** Risultati clinici della popolazione analizzata

<b>Colposcopie</b>	<b>Risultati Istologie</b>		
	no (n)	si (n)	Totale (n)
Impressione colposcopica negativa	96	8	104
Impressione colposcopica di basso grado	27	93	120
Impressione colposcopica di alto grado	0	64	64
Sospetta neoplasia	0	2	2
<b>Totale</b>	<b>123</b>	<b>167</b>	<b>290</b>
<b>Istologie</b>	<b>Numero (n)</b>	<b>Percentuale (%)</b>	<b>Percentuale cumulativa (%)</b>
CIN0	52	28,73	28,73
CIN1	46	25,41	54,14
CIN2	35	19,34	73,48
CIN3	42	23,20	96,69
Carcinoma squamoso	3	1,66	98,34
Adenocarcinoma	3	1,66	100,00

#### **4.2 SENSIBILITÀ, SPECIFICITÀ E CONCORDANZA ANALITICA DEI CAMPIONI ANALIZZATI**

La concordanza tra i campioni vaginali e cervicali nella rilevazione di HPV ad alto rischio eseguiti sulla piattaforma Viper LT presso IEO è mostrata in Tabella 3.

**Tabella 3. Concordanza campioni vaginali e cervicali eseguiti su piattaforma Viper LT presso IEO**

HR HPV vaginale	HR HPV cervicale		
	NEG	POS	Totale (n)
NEG	75	7	82
POS	23	181	204
Totale	98	188	286

Tali dati mostrano una concordanza del 89.5% (K Cohen: 0.76 - Substantial agreement). Onclarity eseguito su campione vaginale autoprelevato con FLOQSwab mostra una sensibilità analitica di 181/188 (0,963; IC 95% [0,924 -0,985]) e una specificità analitica di 75/98 (0,765; IC 95% [0,669-0,845]). La concordanza tra i campioni vaginali e cervicali nella rilevazione di HPV ad alto rischio eseguiti sulla piattaforma Viper LT presso Hvidovre è mostrata in Tabella 4.

**Tabella 4. Concordanza campioni vaginali e cervicali eseguiti su piattaforma Viper LT presso Hvidovre**

HR HPV vaginale	HR HPV cervicale		
	NEG	POS	Totale (n)
NEG	72	4	76
POS	26	184	210
Totale	98	188	286

Tali dati mostrano una concordanza dell'89.5% (K Cohen: 0.75 - Substantial agreement). I test eseguiti con Onclarity a Hvidovre su campione vaginale autoprelevato con FLOQSwab eseguiti con il sistema Viper LT mostrano

una sensibilità analitica di 184/188 (0,979; IC 95% [0,946-0,994]) e una specificità analitica di 72/98 (0,735, IC 95% [0,636-0,829]).

La concordanza tra i campioni vaginali e cervicali nella rilevazione di HPV ad alto rischio eseguiti sulla piattaforma COR presso Hvidovre è mostrata in Tabella 5.

**Tabella 5. Concordanza campioni vaginali e cervicali eseguiti su piattaforma COR presso Hvidovre**

HR HPV vaginale	HR HPV cervicale		
	NEG	POS	Totale (n)
NEG	76	6	82
POS	22	184	206
Totale	98	190	288

Questi dati mostrano una concordanza del 90.2% (K Cohen: 0.77 - Substantial agreement). I test eseguiti con Onclarity a Hvidovre su campione vaginale autoprelevato con FLOQSwab eseguiti con il sistema COR mostrano una sensibilità analitica di 184/190 (0.968, 95% CI [0.933-0.988]) e una specificità analitica di 76/98 (0.776, 95% CI [0.680-0.854]).

Le sensibilità e specificità analitiche nell'individuare i vari genotipi ad alto rischio di HPV per campione vaginale eseguito in IEO su Viper LT, eseguito a Hvidovre su Viper LT ed eseguito a Hvidovre su COR sono riassunti in tabella 6 e 7.

**Tabella 6. Sensibilità analitiche genotipo specifiche**

	<b>Vaginale Viper IEO [95%CI]</b>	<b>Vaginale Viper Hvidovre [95%CI]</b>	<b>Vaginale COR Hvidovre [95%CI]</b>
HRHPV	0.963 [0.924-0.985]	0.979 [0.946 -0.994]	0.968 [0.933 -0.988]
HPV16	1.000 [0.950-1.000]	1.000 [0.950 -1.000]	1.000 [0.951 -1.000]
HPV18	0.714 [0.290-0.963]	0.714 [0.290 -0.963]	0.571 [0.184 -0.901]
HPV31	0.846 [0.695-0.941]	0.923 [0.791 -0.984]	0.875 [0.732 -0.958]
HPV45	1.000 [0.664-1.000]	1.000 [0.664 -1.000]	1.000 [0.664 -1.000]
HPV51	0.923 [0.640-0.998]	1.000 [0.753 -1.000]	1.000 [0.753 -1.000]
HPV52	1.000 [0.846-1.000]	1.000 [0.845 -1.000]	1.000 [0.846 -1.000]
HPV33/58	1.000 [0.851-1.000]	0.957 [0.780 -0.999]	0.957 [0.781 -0.999]
HPV35/39/68	0.933 [0.779-0.992]	1.000 [0.884 -1.000]	1.000 [0.884 -1.000]
HPV56/59/66	0.960 [0.863-0.995]	0.980 [0.894 -0.999]	0.980 [0.894 -0.999]

**Tabella 7. Specificità analitiche genotipo specifiche**

	<b>Vaginale Viper IEO [95%CI]</b>	<b>Vaginale Viper Hvidovre [95%CI]</b>	<b>Vaginale COR Hvidovre [95%CI]</b>
HRHPV	0.765 [0.669-0.845]	0.735 [0.636-0.829]	0.776 [0.680-0.854]
HPV16	0.953 [0.916-0.977]	0.935 [0.893-0.964]	0.944 [0.905-0.971]
HPV18	0.978 [0.954-0.992]	0.986 [0.964-0.996]	0.986 [0.964-0.996]
HPV31	0.964 [0.932-0.983]	0.951 [0.917-0.975]	0.956 [0.922-0.978]
HPV45	0.986 [0.963-0.996]	0.989 [0.969-0.998]	0.989 [0.969-0.998]
HPV51	0.967 [0.938-0.985]	0.982 [0.958-0.994]	0.982 [0.958-0.994]
HPV52	0.966 [0.936-0.984]	0.977 [0.951-0.992]	0.974 [0.947-0.989]
HPV33/58	0.989 [0.967-0.998]	0.981 [0.956-0.994]	0.989 [0.967-0.997]
HPV35/39/68	0.941 [0.905-0.967]	0.949 [0.915-0.973]	0.961 [0.930-0.981]
HPV56/59/66	0.932 [0.892-0.961]	0.936 [0.897-0.964]	0.941 [0.903-0.967]

### **4.3 VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ E DELLA SPECIFICITÀ CLINICA**

Il test Onclarity su campioni cervicali ha rilevato una positività in 74/83 donne con CIN2+ (89.2%) mentre su campione vaginale eseguito in IEO ha rilevato una positività in 75/83 donne con CIN2+ (90.4%). Sette casi non sono stati rilevati dal test su entrambi i tipi di campione, mentre un caso era positivo per HRHPV nel campione cervicale, ma non nel campione vaginale.

Due casi erano positivi per HRHPV nei campioni vaginali, ma non nel cervicale. Pertanto, la sensibilità relativa del test Onclarity eseguito su Viper LT per i campioni vaginali autoprelevati rispetto al campione cervicale prelevato dal medico è 1,014 (IC 95% 0,968-1,061).

Delle 203 donne senza CIN 0 con CIN1, 74 (36.5%) erano HRHPV negative sul campione vaginale eseguito sulla piattaforma Viper LT presso IEO, mentre 89 erano negative sul campione cervicale (43.8%). 108 casi sono risultati positivi per entrambi i campioni, sei erano hrHPV positivi solo sul campione cervicale e 21 solo sul campione vaginale.

Pertanto, la specificità clinica relativa per CIN2+ del test Onclarity eseguito sulla piattaforma Viper LT eseguita presso IEO sul campione vaginale autoprelevato rispetto al campione cervicale è risultata pari a 0,831 (IC 95% 0,733-0,943).

Il test Onclarity su campioni cervicali ha rilevato 73/82 (89%) di CIN2+ mentre sul campione vaginale testato con VIPER presso Hvidovre ha rilevato 74/82 (90.2%) CIN2+. Sette casi sono stati non rilevati su entrambi i tipi di campione, mentre un caso era positivo per HRHPV sul campione cervicale, ma non sul campione vaginale. Due casi erano positivi per HRHPV+ sul campione vaginale testato su VIPER presso Hvidovre, ma non sul campione cervicale.

Pertanto la sensibilità clinica relativa per CIN2+ del test Onclarity eseguito sul campione vaginale testato con Viper LT a Hvidovre rispetto al campione cervicale era 1,014 (IC 95% 0,968-1,062).

Delle 204 donne senza CIN o con CIN1, 68 (33.3%) erano HRHPV negative sul campione vaginale testato su VIPER presso Hvidovre, mentre 89 erano HPV negative sul campione cervicale (43.6%). 112 casi sono risultati positivi per entrambi i campioni, tre erano hrHPV positivi solo sul campione cervicale e 24 solo sul campione vaginale.

La specificità clinica relativa per CIN2+ del test Onclarity eseguito sulla piattaforma Viper LT a Hvidovre sul campione vaginale rispetto al campione cervicale è 0,764 (IC 95% 0,670-0,871).

Il test BD Onclarity HPV su campioni cervicali ha rilevato 74/83 (0,892) di CIN2+ mentre il test BD Onclarity eseguito sul campione vaginale testato su COR ha rilevato 74/83 (0,892) di CIN2+. Sette casi non sono stati rilevati su entrambi i tipi di campione, mentre due casi erano HRHPV positivi sul campione cervicale, ma non sul campione vaginale. Due casi erano HRHPV positivi sul campione vaginale testato su COR, ma non sul cervicale.

La sensibilità clinica relativa per CIN2+ del test Onclarity eseguito sulla piattaforma COR sul campione vaginale rispetto al campione cervicale era 1.000 (IC 95% 0,948-1,054).

Delle 205 donne senza CIN o con CIN1, 73 (35.6%) erano HPV negative sul campione vaginale testato con COR mentre 89 (43.4%) erano HPV negative sul campione cervicale. 112 casi sono risultati positivi per entrambi i campioni, quattro erano HRHPV positivi solo sul campione cervicale e 20 sul campione vaginale.

La specificità clinica relativa per CIN2+ del test Onclarity sul campione vaginale testato su COR rispetto al campione cervicale è 0,820 (IC 95% 0,728-0,924).

I dati delle sensibilità e specificità cliniche assolute e relative per le tre piattaforme analizzate sono rappresentati nelle tabelle 8 e 9.

**Tabella 8. Sensibilità e specificità clinica assolute**

	N	Sensibilità [95%CI] CIN2+	N	Sensibilità [95%CI] CIN3	N	Specificità [95%CI] <CIN2
<b>Cervicale</b>	74/83	0.892 [0.804-0.949]	44/48	0.917 [0.800-0.977]	89/206	0.432 [0.363-0.503]
<b>Vaginale Viper IEO</b>	75/83	0.903 [0.819-0.957]	44/48	0.917 [0.800-0.977]	74/204	0.363 [0.297-0.433]
<b>Vaginale Viper Hvidovre</b>	74/82	0.902 [0.817-0.957]	43/47	0.915 [0.796-0.976]	68/205	0.332 [0.268-0.401]
<b>Vaginale COR Hvidovre</b>	74/83	0.891 [0.804-0.949]	43/48	0.896 [0.773-0.965]	74/206	0.359 [0.294-0.429]



**Tabella 9. Sensibilità e specificità clinica relative dei campioni vaginali rispetto ai cervicali**

	<b>Sensibilità relativa [95%CI] CIN2+</b>	<b>Sensibilità relativa [95%CI] CIN3</b>	<b>Specificità relativa [95%CI] &lt;CIN2</b>
<b>Vaginale Viper IEO</b>	1.014 (0.968-1.061)	1.000 (0.939-1.065)	0.831 (0.733-0.943)
<b>Vaginale VIPER Hvidovre</b>	1.014 (0.968-1.062)	1.000 (0.938-1.067)	0.764 (0.670-0.871)
<b>Vaginale COR Hvidovre</b>	1.000 (0.948-1.054)	0.977 (0.904-1.057)	0.820 (0.728-0.924)

#### **4.4 OTTIMIZZAZIONE DEI CUT-OFF ANALITICI PER MIGLIORARE LA SPECIFICITÀ CLINICA**

È stata inoltre calcolata la sensibilità e la specificità clinica del test Onclarity utilizzando dei cut-off dei cicli soglia ottimizzati per i campioni autoprelevati al fine di poter migliorare i valori di specificità del test, i cui risultati sono riassunti nella tabella 10.

**Tabella 10. Sensibilità e specificità clinica del test Onclarity con cut-off ottimizzati per campioni autoprelevati**

#### **Campione vaginale eseguito su Viper LT presso IEO**

	<b>Sensibilità relativa [95%CI] CIN2+</b>	<b>Sensibilità relativa [95%CI] CIN3</b>	<b>Specificità relativa [95%CI] &lt;CIN2</b>
<i>Cut-off impostati da BD <sup>a</sup>: HPV16 Ct&lt;=38.3, others Ct&lt;=34.2</i>			
Vaginale VIPER	1.014 [0.968-1.061]	1.000 [0.939-1.065]	0.831 [0.733-0.943]
<i>HPV16/18 nessun cambio, altri HR HPV Ct &lt;=31.5</i>			
Vaginale VIPER	1.014 [0.968-1.061]	1.000 [0.939-1.065]	0.910 [0.813-1.019]
<i>HPV16 Ct&lt;=34.5, HPV18 Ct &lt;=34.2, altri HR-HPV Ct &lt;=31.5</i>			
Vaginale VIPER	1.000 [0.948-1.054]	1.000 [0.939-1.065]	0.921 [0.825-1.029]
<i>HPV16 Ct&lt;=34.5, HPV18 Ct &lt;=34.2, altri HR-HPV Ct &lt;=30</i>			

1st vaginal	0.986 [0.942-1.033]	1.000 [0.939-1.065]	1.000 [0.902-1.109]
<i>HPV16 Ct&lt;=34.5, HPV18 Ct &lt;=34.2, altri HR-HPV Ct &lt;=29</i>			
Vaginale VIPER	0.986 [0.942-1.033]	1.000 [0.939-1.065]	1.079 [0.970-1.200]

<sup>a</sup>Cut-off impostati da BD per rilevate CIN2+ su campioni cervicali

### Campione vaginale eseguito su VIPER LT presso Hvidovre

	Sensibilità relativa [95%CI] CIN2+	Sensibilità relativa [95%CI] CIN3	Specificità relativa [95%CI] <CIN2
<i>Cut-off impostati da BD <sup>a</sup>: HPV16 Ct&lt;=38.3, others Ct&lt;=34.2</i>			
Vaginale VIPER	1.014 (0.968-1.062)	1.000 (0.938-1.067)	0.764 (0.670-0.871)
<i>HPV16/18 nessun cambio, altri HR HPV Ct &lt;=31.5</i>			
Vaginale VIPER	1.000 [0.963-1.039]	1.000 [0.938-1.067]	0.933 [0.834-1.043]
<i>HPV16 Ct&lt;=34.5, HPV18 Ct &lt;=34.2, altri HR HPV Ct &lt;=31.5</i>			
Vaginale VIPER	0.973 [0.921-1.027]	0.953 [0.869-1.047]	0.978 [0.881-1.085]

<sup>a</sup>Cut-off impostati da BD per rilevate CIN2+ su campioni cervicali

### Campione vaginale eseguito su COR presso Hvidovre

	Sensibilità relativa [95%CI] CIN2+	Sensibilità relativa [95%CI] CIN3	Specificità relativa [95%CI] <CIN2
<i>Cut-off impostati da BD <sup>a</sup>: HPV16 Ct&lt;=38.3, others Ct&lt;=34.2</i>			
Vaginale COR	1.000 (0.948-1.054)	0.977 (0.904-1.057)	0.820 (0.728-0.924)
<i>HPV16/18 nessun cambio, altri HR HPV Ct &lt;=32.2</i>			
Vaginale COR	0.986 [0.929-1.047]	0.955 [0.871-1.046]	0.944 [0.843-1.057]
<i>HPV16 Ct&lt;=36.9, HPV18 Ct &lt;=34.2, altri HR HPV Ct &lt;=32.2</i>			
Vaginale COR	0.986 [0.929-1.047]	0.955 [0.871-1.046]	0.966 [0.868-1.076]

<sup>a</sup>Cut-off impostati da BD per rilevate CIN2+ su campioni cervicali

## 4.5 ANALISI DEI CAMPIONI DI URINA PRELEVATI CON URISPONGE

Non è stato possibile analizzare i risultati del test Onclarity eseguito sulla piattaforma Viper LT presso IEO dei campioni urinari prelevati con UriSponge in quanto il test ha rilevato un alto tasso di campioni non idonei (IC failure). In questi campioni il test non è stato in grado di amplificare il gene della Beta-globina umana, che serve da controllo interno alla reazione di estrazione di DNA e PCR, a causa della bassa cellularità o della degradazione del DNA presente nel campione.

Onclarity è in grado, in caso di positività per HPV e negatività delle Beta-globina, di rilasciare comunque un risultato positivo per HRHPV e negativo per Beta-globina, ma considerabile attendibile. Tuttavia in questo studio

Onclarity non è stato in grado di produrre nessun risultato per 91 campioni (31%).

## DISCUSSIONE

Lo studio “Extended VALHUDES” si poneva come obiettivo primario di estendere la validazione dell’HPV test Onclarity prodotto da BD su campioni vaginali autoprelevati con il sistema Copan FLOQswab nella rilevazione di lesioni preneoplastiche di grado 2 o superiori.

I campioni vaginali autoprelevati hanno prodotto una buona mole di risultati dimostrando che il campione vaginale è un buon campione su cui eseguire l’HPV test e idoneo al trasporto e alla conservazione anche a temperatura ambiente: dopo la raccolta infatti, i campioni possono essere conservati fino a 30 giorni a temperatura ambiente, tempo che permette agevolmente la spedizione del campione al laboratorio di esecuzione del test.

La sensibilità clinica del test HPV BD Onclarity sul campione vaginale processato sulla piattaforma Viper LT in IEO per CIN2+ (rapporto=1,014 [95%CI 0,968-1,061]) e CIN3+ (rapporto=1,000 [95%CI 0,939-1,065]) era paragonabile ai campioni cervicali, mentre la specificità clinica per <CIN2 del test sul campione vaginale era del 17% inferiore rispetto al campione cervicale (rapporto=0,831 [IC 95% 0,733-0,943]).

Questi risultati non sono in linea con i precedenti risultati del Belgian VALHUDES. Nel precedente studio infatti, la sensibilità per CIN2+ su campioni vaginali autoprelevati con i dispositivi di autoprelievo Evalyn Brush e Qvintip in generale non era diversa da quella cervicale (rapporto=0,96 [95%CI 0,90-1,03]), mentre la specificità era significativamente più alta (rapporto=1,09 [IC 95% 1,02-1,16]). La sensibilità e specificità relativa dell’autoprelievo rispetto al prelievo eseguito dal medico differiva in base al tipo di dispositivo di raccolta vaginale: queste erano rispettivamente 1,00 [IC 95% 0,94-1,06] e 1,15 [IC 95% 1,05-1,25] per Evalyn-Brush e 0,91 [IC 95% 0,79-1,04] e 1,03 [IC 95% 0,95-1,13], per Qvintip (Latsuzbaia et al., 2023).

Quindi le differenze rilevate rispetto ai dati riportati nel Belgian VALHUDES potrebbero essere spiegate con l’utilizzo di un diverso dispositivo di prelievo. Tuttavia, la differenza maggiore che emerge con il precedente VALHUDES è che nello studio Belgian VALHUDES i campioni vaginali

autoprelevati erano risospesi in una fiala da 20mL di liquido Preservcyt (Thin Prep) e poi 500 microlitri di questa aggiunti alla fiala LBC di BD per il test Onclarity.

Nel nostro studio, il tampone vaginale FLOQswab veniva risospeso nell'apposita fiala BD per campioni autoprelevati contenente 3mL di liquido. Questo ha determinato una diversa concentrazione del campione che risulta notevolmente più concentrato nell'Extended VALHUDES rispetto allo studio Belgian VALHUDES. Questa maggiore concentrazione del campione vaginale nello studio Extended VALHUDES ha determinato una perdita di specificità del test, in quanto la specificità è indice della capacità di un test di trovare "veri negativi" e di non rilevare "falsi negativi".

Al fine di allinearsi con i requisiti VALHUDES è stata analizzata la sensibilità e specificità clinica di Onclarity sulle tre piattaforme al variare dei cut-off: a causa della più elevata concentrazione del campione vaginale rispetto al cervicale, che viene considerato come test di riferimento, si è quindi deciso di analizzare come variavano sensibilità e specificità clinica del test vaginale sulle tre piattaforme abbassando il cut-off dei cicli soglia (Ct).

Per quanto riguarda il test Onclarity eseguito sulla piattaforma Viper LT presso IEO, la regolazione dei valori di cut-off dei Ct ha comportato un miglioramento della specificità clinica. Abbassando infatti i cicli soglia rispetto a quelli stabiliti da BD per i campioni cervicali, per HPV16  $Ct \leq 34.5$ , per HPV18  $Ct \leq 34.2$  e per gli altri HPV ad alto rischio  $Ct \leq 29$  si ottiene una migliore specificità clinica (rapporto=1,079 [IC 95% 0,970-1,200]) con una leggera perdita di sensibilità clinica (rapporto=0,986 [IC 95% 0,942-1,033]).

Questo è in linea con quanto precedentemente ipotizzato, cioè che il campione vaginale sia più concentrato di quello cervicale per la diluizione del tampone FLOQSwab in 3ml di liquido e che possano essere rilevate infezioni da HPV non provenienti dalla cervice uterina, peccando così di specificità e che l'innalzamento dei Ct possa migliorarne la specificità clinica senza intaccarne la sensibilità.

Lo stesso comportamento è stato rilevato anche sui test Onclarity eseguiti a Hvidovre: il campione vaginale testato su VIPER ha mostrato una sensibilità clinica relativa per CIN2+ (rapporto=1,014 [IC 95% 0,968-1,062]) e per CIN3+ (rapporto=1,000 [IC 95% 0,938-1,067]) simile a quella cervicale. La specificità clinica relativa per <CIN2 era del 24% inferiore rispetto ai campioni cervicali (rapporto=0,764 [IC 95% 0,670-0,871]).

La variazione dei valori di cut-off dei cicli soglia della PCR ha comportato un miglioramento della specificità clinica (rapporto=0,978 [IC 95% 0,881-1,085]) con una leggera perdita di sensibilità clinica (rapporto=0,973 [0,921-1,027]).

Anche sulla piattaforma COR si assiste ad una situazione analoga: Il test Onclarity HPV sul campione vaginale mostrava una sensibilità clinica simile rispetto ai campioni cervicali per CIN2+ (rapporto=1,000 [IC 95% 0,948-1,054]) e CIN3+ (rapporto=0,977 [95] %CI 0,904-1,057)), mentre la specificità clinica per <CIN2 era significativamente inferiore rispetto ai campioni cervicali (rapporto=0,820 [IC 95% 0,728-0,924]).

Dopo aver aggiustato i valori di cut-off, la specificità clinica relativa del campione vaginale testato su COR migliorava notevolmente (rapporto=0,966 [0,868-1,076]) con una leggera perdita di sensibilità clinica (rapporto=0,986 [IC 95% 0,929-1,047]).

Questi dati, seppure non in linea con i requisiti di non-inferiorità riportati nel protocollo VALHUDES per la bassa specificità clinica ottenuta possono comunque essere clinicamente validi (Arbyn et al., 2018). Questo perché nello screening è importante impiegare un test che sia il più possibile sensibile nel rilevare la patologia, e lasciando a idonei test di triage, la possibilità di innalzare la specificità del test.

Poiché il fine dell'autocampionamento è quello di raggiungere donne che non parteciperebbero allo screening, l'elevata sensibilità del test ne è caratteristica peculiare da tenere comunque in considerazione.

Altra considerazione da fare è sulla diversità della natura del campione: il campionamento sulla cervice viene eseguito dall'operatore sanitario specializzato direttamente sul sito cervicale (sia eso- che endo-cervice

uterina), mentre l'autocampionamento vaginale eseguito dalla donna potrebbe raccogliere più tipi di HPV presenti nell'habitat vaginale e non direttamente correlati al sito cervicale.

Gli HPV test che vanno a ricercare DNA dei genotipi ad alto rischio oncogeno di HPV hanno una soglia che è relativa alla carica di HPV di una lesione CIN2, ma non distingue tra forme episomali o integrate del virus. Sebbene il virus in forma episomale non si replichi nella cellula ospite, determinando così una carica di DNA virale non significativa, non è noto quanto DNA di HPV possa essere presente nell'habitat vaginale anche privo di lesioni preneoplastiche cervicali (Bienkowska-Haba et al., 2023).

Onclarity è un HPV test che è stato validato a livello internazionale per campioni di citologia in fase liquida per l'uso nello screening primario dell'HPV sia secondo le linee guida di Mejer che secondo il protocollo per la genotipizzazione VALGENT (Ejegod et al., 2015; Cuschieri et al., 2015). Il test nel 2018 ha ricevuto l'approvazione della FDA per lo screening primario in donne sopra i 25 anni negli Stati Uniti (Wright et al., 2018).

La validità clinica di Onclarity e la sua equivalenza ad altri HPV test sono stati ben stabiliti: anche una revisione sistematica e meta-analisi ha elencato Onclarity tra i test HRHPV che soddisfano criteri internazionali per l'uso nello screening primario (Arbyn et al., 2015). Anche lo studio VALGENT 2 ha dimostrato sensibilità e specificità per CIN2+ di Onclarity non inferiori rispetto all'utilizzo della PCR GP5+/6+ in campioni ThinPrep dello Scottish Cervical Cancer Screening Program (Cuschieri et al., 2015). Oltre allo screening, Onclarity è stato ampiamente applicato in altri contesti, compreso il triage della citologia e il follow-up post trattamento chirurgico delle lesioni CIN2+. Il test ha dimostrato buone prestazioni nel follow-up post trattamento chirurgico, stabilendo che la persistenza specifica del genotipo dell'HPV potrebbe rappresentare una valida opzione per il monitoraggio dei pazienti trattati per lesioni CIN2+ poiché le recidive sono state rilevate solo nei pazienti con persistenza dello stesso genotipo rilevato al basale (Bottari et al., 2019).

Lo studio aveva come obiettivo anche quello di estendere la validazione di Onclarity al sistema di autoprelievo di campioni urinari Copan Urisponge: questo purtroppo non è stato possibile visto l'alto tasso di rilevazione da parte di Onclarity eseguito su VIPER LT presso IEO di campioni "IC failure". Un campione IC failure è un campione non idoneo all'analisi per il quale non è stato possibile amplificare il gene della Beta globina umana. È pertanto questo un campione con poche cellule o in cui il DNA si è degradato. In questo studio più di un terzo dei campioni (31%) ha ottenuto risultato IC failure.

Tali risultati non sono in linea con quelli ottenuti da altri gruppi di ricerca: dati recenti mostrano come gli HPV test basati su RT-PCR di campioni urinari siano uno strumento valido in termini di sensibilità e specificità e al fine di abbattere barriere socio-culturali al fine di aumentare l'aderenza ai programmi di screening di donne che non avrebbero partecipato (De Pauw et al., 2021).

Van Keer e collaboratori con lo stesso Onclarity hanno rilevato per le urine di primo mitto autoprelevate col dispositivo ColliPee una sensibilità simile sia per CIN2+ (rapporto 1,00; IC 95%: 0,93-1,07) che per CIN3 (rapporto 0,98; IC 95%: 0,88-1,08) e marginalmente meno specifico per <CIN2 (rapporto 0,92; IC 95%: 0,84-0,996) rispetto ai campioni cervicali. La concordanza del test HPV tra coppie di campioni espressa come Kappa di Cohen era da moderata a eccellente per l'HRHPV complessivo e per i singoli genotipi (o gruppi) ( $\kappa = 0,56-0,85$ ) (Van Keer et al., 2022).

Sono però presenti in letteratura prevalentemente dati sul dispositivo ColliPee di Novosanis come dispositivo di autoprelievo per campioni urinari (Van Keer et al., 2021, Van Keer et al., 2022) che ha il vantaggio di contenere un liquido stabilizzante per gli acidi nucleici ed ingegnerizzato per prelevare solo il primo-mitto di urina.

Ad oggi, non ci sono dati in letteratura di studi precedenti che presentano dati di performance del dispositivo per autocampionamento urinario UriSponge.



Sono state fatte varie ipotesi in merito al motivo di questa alta percentuale di campioni non idonea tra i campioni urinari. Questo poiché non abbiamo verificato una simile situazione per i campioni vaginali. Una possibilità potrebbe risiedere nel fatto che i campioni urinari sono stati raccolti a Sassari e spediti con cadenza settimanale e Milano presso UNIMIB. Il reclutamento è avvenuto principalmente nei mesi estivi e le temperature nei trasferimenti, potrebbero avere influito nella conservazione dei campioni.

Anche i campioni urinari arruolati presso IEO venivano spediti settimanalmente a UNIMIB. Infatti, anche se con un tasso inferiore, troviamo un discreto numero di campioni non idonei anche tra gli urinari reclutati presso l'ambulatorio di colposcopia IEO.

Sono stati ottenuti 55 campioni urinari non idonei tra i campioni reclutati a Sassari e 36 campioni urinari non idonei tra i campioni reclutati in IEO.

Per la natura del dispositivo Urisponge, l'urina e le relative cellule restano adese nella spugna del dispositivo, per essere poi rilasciata mediante centrifugazione. Il dispositivo, pur avendo uno stabilizzante che permette all'urina di minimizzare la proliferazione batterica, non ha un conservante per gli acidi nucleici.

Inoltre il protocollo della piattaforma Viper LT per la gestione di campioni urinari e proposto da Ricerca e Sviluppo (R&D) di BD non prevede la fase di pre-warm del campione. Questo perché i cicli di denaturazione ad alta temperatura previsti dalla fase di pre-warm potrebbero far evaporare il campione.

Questo però ha generato una diminuzione in termini di resa estrattiva del test Onclarity.

Pertanto le ulteriori due aliquote di campioni urinari di Urisponge, al momento conservate presso la Biobanca di UNIMIB, verranno testate in futuro cercando di ottimizzare il protocollo al fine di diminuire la percentuale di campioni non idonei.

Aver validato il test BD Onclarity eseguito sulle piattaforme BD Viper LT e COR in termini di sensibilità e specificità clinica su campioni vaginali autoprelevati con FLOQSwab, apre ad un nuovo scenario, dove non è più

necessario un operatore sanitario specializzato per eseguire il campionamento, ma è la donna stessa che esegue il prelievo di materiale biologico da analizzare.

Questo ha un grandissimo valore e impatto in termini di Sanità Pubblica: oltre ad aumentare la copertura dello screening a donne che non avrebbero partecipato ai programmi regolari che prevedono un prelievo cervicale da parte del personale sanitario specializzato, la validazione di un test di screening con consecutiva genotipizzazione estende il suo utilizzo anche in contesti diversi dallo screening.

La genotipizzazione infatti è uno degli strumenti che può avere un grande valore in setting come il follow-up dei positivi o il follow-up post trattamento, in quanto con la genotipizzazione possiamo valutare la persistenza di un determinato genotipo, andando a conoscere non solo la positività per HPV, ma anche se tale positività è sostenuta dal solito ceppo virale, con conseguente aumento di rischio nello sviluppo di una lesione preneoplastica.

In un futuro prossimo, si potrebbe immaginare che la donna possa eseguire il prelievo a domicilio, lo spedisca al laboratorio che esegue il test prima della visita con il clinico e quindi giunga alla visita con già l'esito dell'HPV test, potendo così ricevere un appropriato counseling sull'esito del test e sulle sue eventuali implicazioni cliniche da parte del ginecologo e conoscere il proprio percorso di follow-up.

Inoltre in un periodo post-pandemico, come quello che stiamo vivendo, poter accedere alle strutture sanitarie il meno possibile è un modo per prevenire possibili contagi da COVID19.

## 5 CONCLUSIONE

In conclusione, i dati ottenuti dallo studio Extended VALHUDES mostrano una buona concordanza e sensibilità clinica del test HPV BD Onclarity su campioni vaginali autoprelevati col sistema FLOQSwab e testati sulle piattaforme BD Viper LT e BD COR.

Ottimizzando i cut-off dei cicli soglia del test Onclarity è stato possibile raggiungere un efficiente livello di sensibilità e specificità clinica relativa al campione cervicale, come richiesto dal protocollo VALHUDES.

Non è stato possibile al momento valutare i campioni urinari raccolti con il dispositivo UriSponge e testati con Onclarity su Viper LT in quanto con il protocollo utilizzato per i campioni vaginali e cervicali è stato ottenuto un alto tasso di campioni invalidi.

L'utilizzo di un HPV test che permette la genotipizzazione estesa a tutti i genotipi ad alto rischio oncogeno, apre lo scenario all'utilizzo di tale test anche in setting diversi dallo screening, dove conoscere la persistenza genotipo specifica può essere un valore aggiunto per il clinico.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- 1) Zur Hausen, H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers: a brief historical account. *Virology* 384:260–265.
- 2) De Villiers E. M., Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zurHausen H (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*;324(1):17-27.
- 3) Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:518-27.
- 4) Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 321–322.
- 5) Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209–49.
- 6) Long HJ 3rd, Laack NNI, Gostout BS. Prevention, diagnosis, and treatment of cervical cancer. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82:1566-74.

- 7) Egawa N. Papillomaviruses and cancer: commonalities and differences in HPV carcinogenesis at different sites of the body. *Int J Clin Oncol*. 2023 May 18.
- 8) Soheili M, Keyvani H, Soheili M, Nasser S. Human papilloma virus: A review study of epidemiology, carcinogenesis, diagnostic methods, and treatment of all HPV-related cancers. *Med J Islam Repub Iran*. 2021 May 22;35:65.
- 9) Ronco G, Biggeri A, Confortini M, et al. HTA report: Ricerca del DNA di papilloma virus umano (HPV) come test primario per lo screening dei precursori del cancro del collo uterino. *Epidemiol Prev* 2012;36 (3/4 suppl 1): e1-e72.
- 10) Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Ghiringhello B, Girlando S, Gillio-Tos A, De Marco L, Naldoni C, Pierotti P, Rizzolo R, Schincaglia P, Zorzi M, Zappa M, Segnan N, Cuzick J; New Technologies for Cervical Cancer screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2010 Mar;11(3):249-57.
- 11) Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, Dillner J, Meijer CJ. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. 2008 Aug 19;26 Suppl 10: K29-41.
- 12) Von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Res* 2015; 1:22-31.

- 13) Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol.* 2015; 136:189-97.
- 14) Istituto Superiore di Sanità EpiCentro - L'epidemiologia per la sanità pubblica. <https://www.epicentro.iss.it/passi/dati/ScreeningCervicale#dati> (Ultimo accesso: 19/07/2023).
- 15) Marlow LAV, Waller J, Wardle J. Barriers to cervical cancer screening among ethnic minority woman: a qualitative study. *J FamPlannReprodHealt Care* (2015) 41:248-54.
- 16) Benard VB, Jackson JE, Greek A, Senkomago V, Huh WK, Thomas CC, Richardson LC. A population study of screening history and diagnostic outcomes of women with invasive cervical cancer. *Cancer Med.* 2021 Jun;10(12):4127-4137.
- 17) WHO. WHO Director-General calls for all countries to take action to help end the suffering caused by cervical cancer. May 19, 2018. <https://www.who.int/reproductivehealth/call-to-action-elimination-cervical-cancer/en/> (Ultimo accesso 06/09/2019).
- 18) Poljak M, Oštrbenk Valenčak A, Gimpelj Domjanič G, Xu L, Arbyn M. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Sep;26(9):1144-1150.

- 19) Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009 Feb 1;124(3):516-20.
- 20) Arbyn M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Cuschieri K, Schmitt M, Pawlita M, Geraets D, Heard I, Gheit T, Tommasino M, Poljak M, Bonde J, Quint W. VALGENT: A protocol for clinical validation of human papillomavirus assays. *J Clin Virol*. 2016 Mar;76 Suppl 1: S14-S21.
- 21) F. Verdoodt, M. Jentschke, P. Hillemanns, C.S. Racey, P.J.F. Snijders, M. Arbyn. Reaching women who do not participate in the regular cervical cancer screening program by offering self-sampling kits: a systematic review and meta-analysis of randomised trials, *Eur. J. Cancer* 51 (2015) 2375–2385.
- 22) Serrano B, Ibáñez R, Robles C, Peremiquel-Trillas P, de Sanjosé S, Bruni L. Worldwide use of HPV self-sampling for cervical cancer screening. *Prev Med*. (2022) Jan;154: 106900.
- 23) Mao C, Kulasingam SL, Whitham HK, Hawes SE, Lin J, Kiviat NB. Clinician and Patient Acceptability of Self-Collected Human Papillomavirus Testing for Cervical Cancer Screening. *J Womens Health (Larchmt)*. 2017 Jun;26(6):609-615.
- 24) Vorsters A, Van den Bergh J, Micalessi I, Biesmans S, Bogers J, Hens A, De Coster I, Ieven M, Van Damme P. Optimization of HPV DNA detection in urine by improving collection, storage, and extraction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33: 2005-14.

- 25) Arbyn M, Smith SB, Temin S, Sultana F, Castle P; Collaboration on Self-Sampling and HPV Testing. Detecting cervical precancer and reaching underscreened women by using HPV testing on self samples: updated meta-analyses. *BMJ*. 2018 Dec 5; 363: k4823.
- 26) Arbyn M, Peeters E, Benoy I, Vanden Broeck D, Bogers J, De Sutter P, et al. VALHUDES: A protocol for validation of human papillomavirus assays and collection devices for HPV testing on self-samples and urine samples. *J Clin Virol*. 2018; 107: 52-56.
- 27) Depuydt CE, Benoy IH, Beert JF, Criel AM, Bogers JJ, Arbyn M. Clinical validation of a type-specific real time quantitative human papillomavirus PCR to the performance of hybrid capture 2 for the purpose of cervical cancer screening, *J. Clin. Microbiol.* 10 (October (50)) (2012) 4073–4077.
- 28) Latsuzbaia A, Vanden Broeck D, Van Keer S, Weyers S, Donders G, Doyen J, Tjalma W, De Sutter P, Peeters E, Vorsters A, Arbyn M. Validation of BD Onclarity HPV Assay on Vaginal Self-Samples versus Cervical Samples Using the VALHUDES Protocol. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2022 Dec 5;31(12):2177-2184.
- 29) Van Keer S, Latsuzbaia A, Vanden Broeck D, De Sutter P, Donders G, Doyen J, Tjalma WAA, Weyers S, Arbyn M, Vorsters A. Analytical and clinical performance of extended HPV genotyping with BD Onclarity HPV Assay in home-collected first-void urine: A diagnostic test accuracy study. *J Clin Virol*. 2022 Oct; 155: 105271.



- 30) Arbyn M, Costa S, Latsuzbaia A, Kellen E, Girogi Rossi P, Cocuzza CE, Basu P, Castle PE. HPV-based Cervical Cancer Screening on Self-samples in the Netherlands: Challenges to Reach Women and Test Performance Questions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2023 Feb 6;32(2):159-163.
- 31) Arbyn M, Simon M, Peeters E, Xu L, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Bonde J, Ostrbenk Vanlencak A, Zhao F-H, Rezhake R, Gultekin M, Dillner J, de Sanjosé S, Canfell K, Hillemanns P, Almonte M, Wentzensen N, Poljak M. 2021. 2020 list of human papillomavirus assays suitable for primary cervical cancer screening. *Clin Microbiol Infect* 27:1083–1095.
- 32) Belinson JL, Hu S, Niyazi M, Pretorius RG, Wang H, Wen C, Smith JS, Li J, Taddeo FJ, Burchette RJ, Qiao Y-L. 2010. Prevalence of type-specific human papillomavirus in endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: implications for vaginal self-collection. *Int J Cancer* 127:1151–1157.
- 33) Bienkowska-Haba M, Zwolinska K, Keiffer T, Scott RS, Sapp M. Human Papillomavirus Genome Copy Number Is Maintained by S-Phase Amplification, Genome Loss to the Cytosol during Mitosis, and Degradation in G1 Phase. *J Virol.* 2023 Feb 7: e0187922.
- 34) Ejegod D, Bottari F, Pedersen H, et al. The BD onclarity HPV assay on samples collected in surepath medium meets the international guidelines for human papillomavirus test requirements for cervical screening. *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 2267–2272.

- 35) Cuschieri K, Geraets DT, Moore C, et al. Clinical and analytical performance of the onclarity HPV assay using the VALGENT framework. *J Clin Microbiol.* 2015 Oct;53(10):3272–3279.
- 36) Wright TC Jr., Stoler MH, Parvu V, et al. Detection of cervical neoplasia by human papillomavirus testing in an atypical squamous cells-undetermined significance population: results of the becton dickinson onclarity trial. *Am J Clin Pathol.* 2018.
- 37) De Pauw H, Donders G, Weyers S, De Sutter P, Doyen J, Tjalma WAA, Vanden Broeck D, Peeters E, Van Keer S, Vorsters A, Arbyn M. Cervical cancer screening using HPV tests on self-samples: attitudes and preferences of women participating in the VALHUDES study. *Arch Public Health.* 2021 Aug 30;79(1):155.
- 38) Van Keer S, Latsuzbaia A, Vanden Broeck D, De Sutter P, Donders G, Doyen J, Tjalma WAA, Weyers S, Arbyn M, Vorsters A. Analytical and clinical performance of extended HPV genotyping with BD Onclarity HPV Assay in home-collected first-void urine: A diagnostic test accuracy study. *J Clin Virol.* 2022 Oct; 155: 105271.
- 39) Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, et al. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin Microbiol Infect.* 2015 Sep;21(9):817–826.
- 40) Bottari F, Iacobone AD, Boveri S, Preti EP, Franchi D, Mariani L, Preti M, Landoni F, Passerini R, Sandri MT. Onclarity human papillomavirus extended

genotyping in the management of cervical intraepithelial neoplasia 2+ lesions.  
J Low Genit Tract Dis. 2019 Jan;23 (1):39–42.

## 8. RINGRAZIAMENTI

Colgo l'occasione per ringraziare tutte le persone che mi sono state vicino in questi tre anni di Dottorato di ricerca.

In primis, la mia famiglia, Francesca Alice e Anna (in ordine anagrafico) che non hanno mai smesso di incoraggiarmi e sostenermi e che sono la mia ancora nel mare della vita.

Ringrazio Daniela, che ha condiviso con me questo percorso di studi, percorso che ha visto anche qualche ostacolo, e solo la condivisione di questi li ha resi meno duri da superare.

Un ringraziamento a Marianna che mi ha consigliato nella stesura di questa tesi di Dottorato.

Vorrei ringraziare in particolar modo poi la Prof.ssa Cocuzza, senza la quale non sarebbe mai neppure cominciata questa esperienza e che non ha mai smesso di adoperarsi per fare andare avanti questa ricerca.

Infine, ma non in ordine di importanza, ringraziare il Prof. Piana, col quale è stato possibile instaurare un bel rapporto di stima ed amicizia che è andato oltre al rapporto professionale e che spero non si esaurisca qui.