

# Diagnostika HPV

Jana Šmahelová

NRL pro papillomaviry a polyomaviry

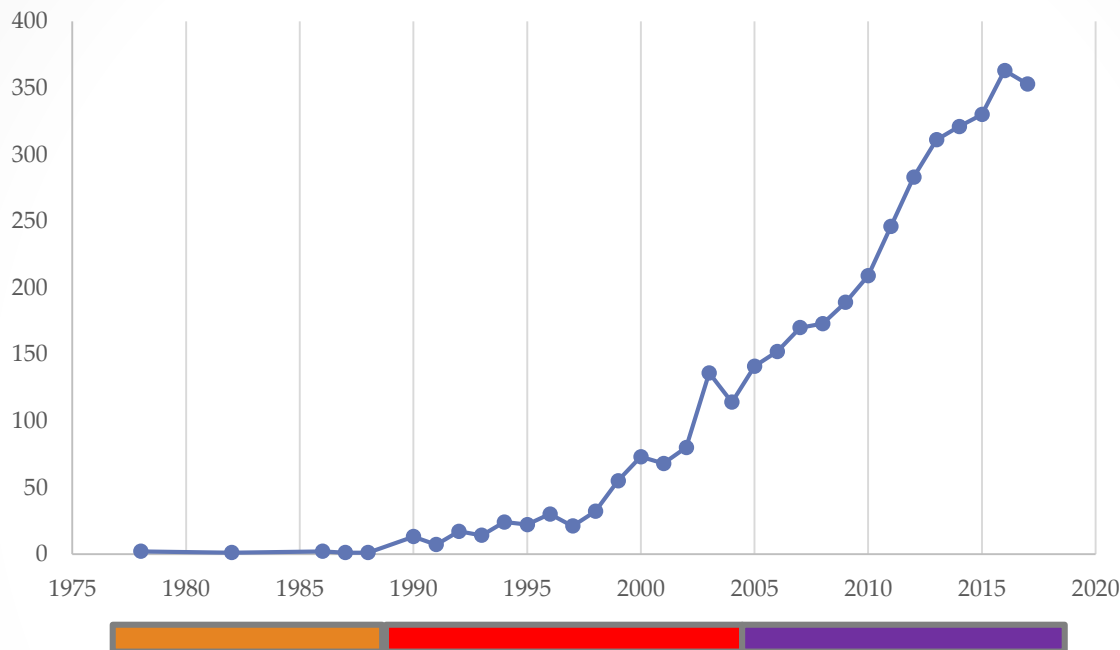


PŘÍRODOVĚDECKÁ  
FAKULTA  
Univerzita Karlova



# Diagnostika HPV

Počet publikací



asociace HPV  
infekce s KDH,  
izolace a  
zaklonování HPV  
16 a 18

rozvoj  
molekulárně  
biologických  
technik  
detekce NK

využití a  
aplikace HPV  
testování v  
klinické praxi

# Human Microbiom Project



- NGS - studium mikrobiomu
- přímá analýza mikrobiálních genomů

Zdraví dospělí (n=103) S. Amerika  
Celková prevalence HPV 68%

- 200 genotypů – HPV 210
- 5 rodů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ )
- **subklinický**
- klinický průběh infekce

Ústa 30%

Kůže 61%

1, 138	107,12,147 148,155,17	10,104,109,110,111,112 115,116,119,120,122	
26	19,20,24,36	124,127,129,130,132	
32	4,49,5,50,58	133,136,137,139,14,141	
145	8,80,9,98	143,149,15,151,156,2	
		22,23,37,48,60,65,75,76	
		92,93,95,96	
			28,47
			101,18,42
135	144,126		103,106,16,39,43
62	146,153	118,121,128,131,134	51,52,53,56,59,6,61
66	21,38,N	142,150,34,45,88	67,72,73,74,83,89
			90,91

Střevo

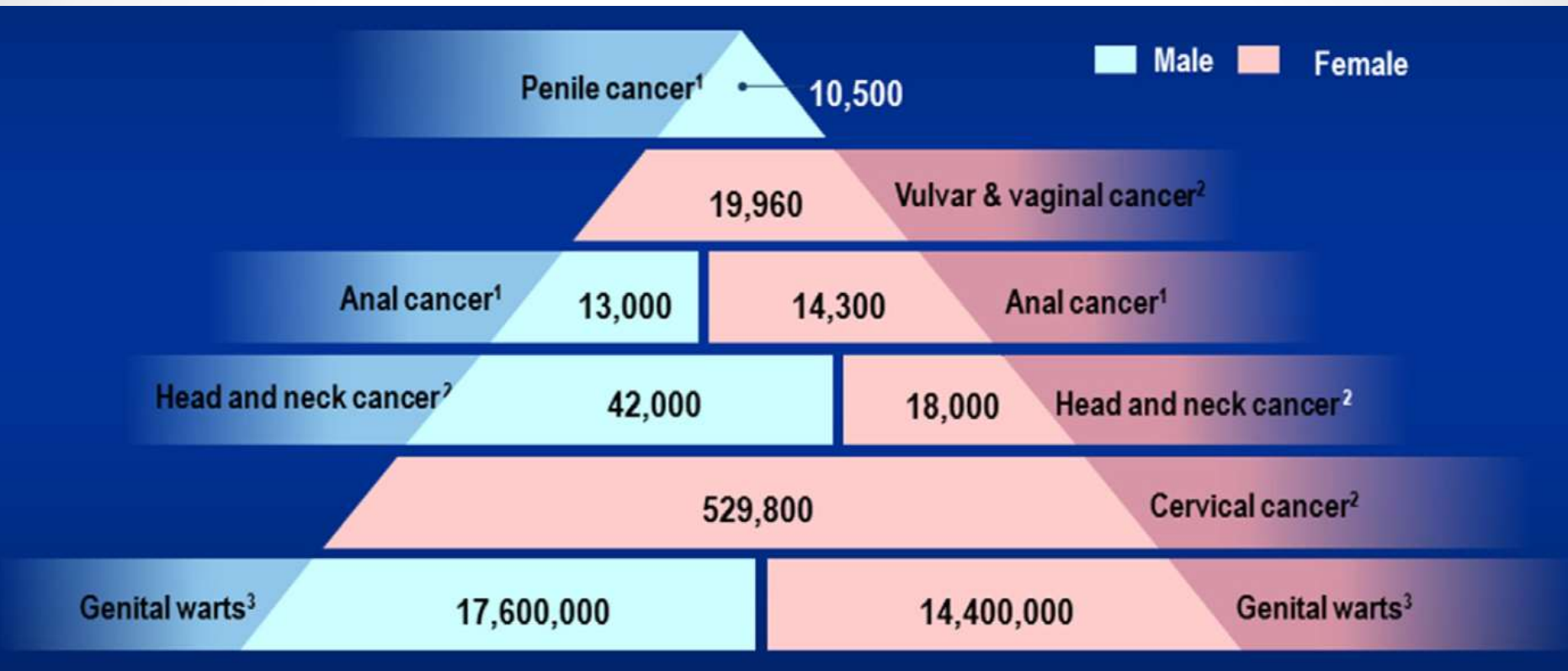
17%

Vagina

41%

Ma a spol., J Virol 2014

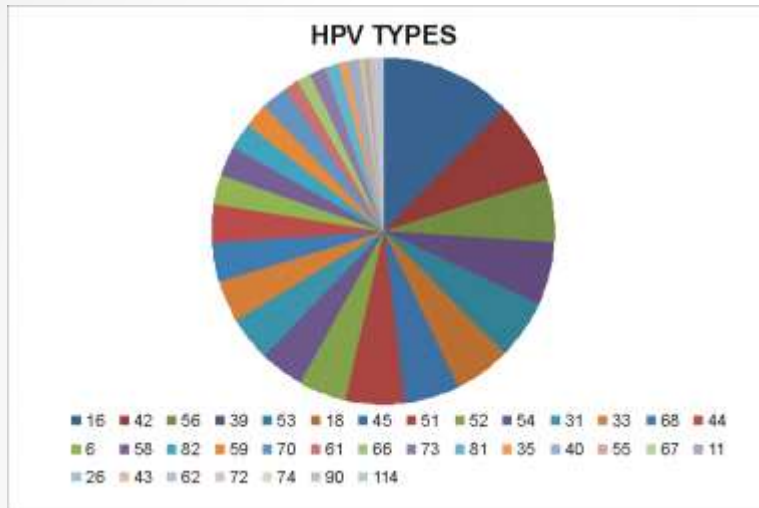
# Roční odhad celkového počtu nově diagnostikovaných pacientů s chorobami asociovanými s HPV



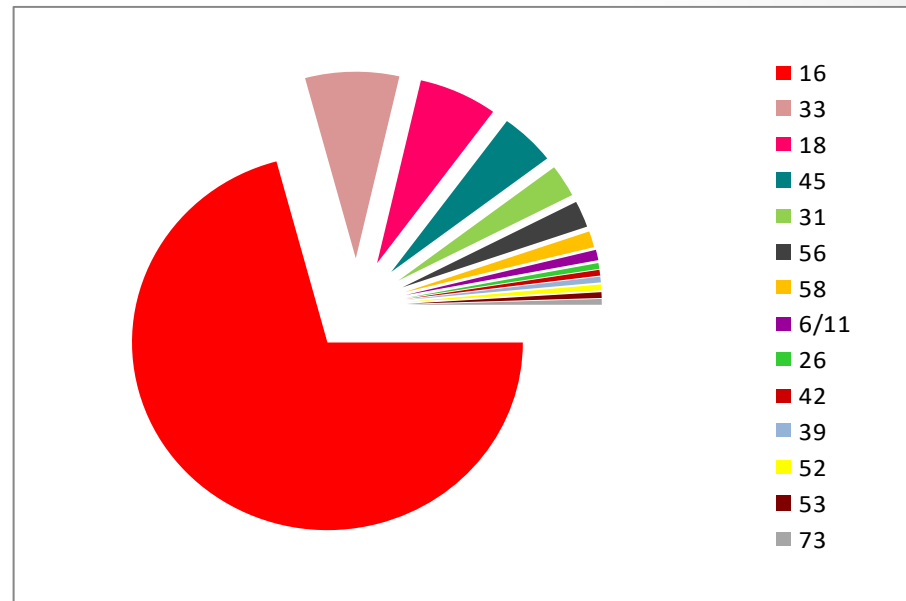
Stanley, J Infect 2016

# Typově specifická prevalence dle lézí

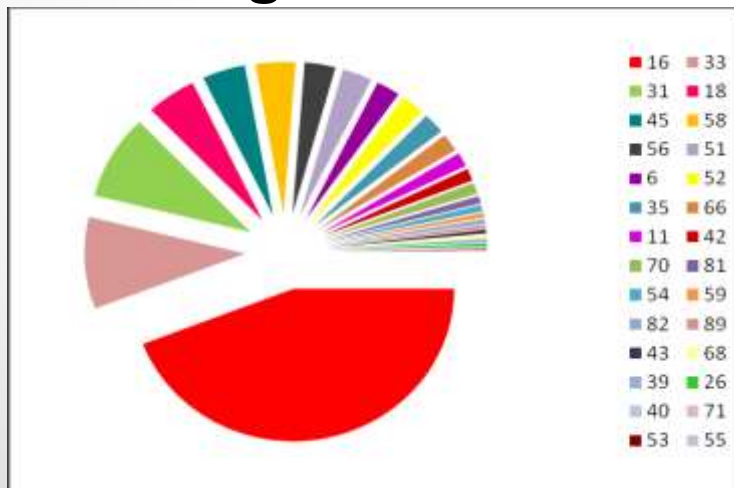
## Screeningová populace



## Karcinomy

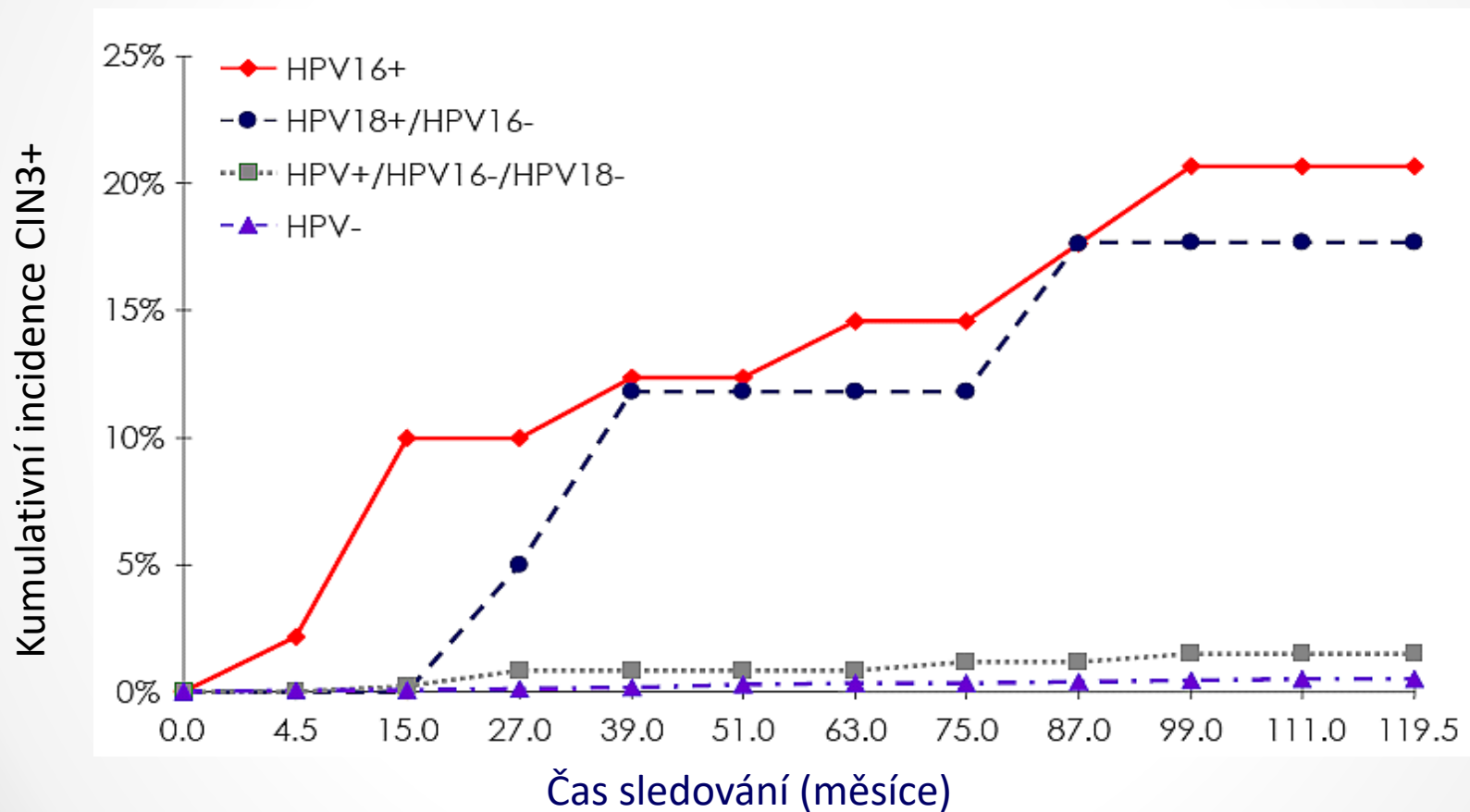


## Premalignní léze



Tachezy a spol., 2013

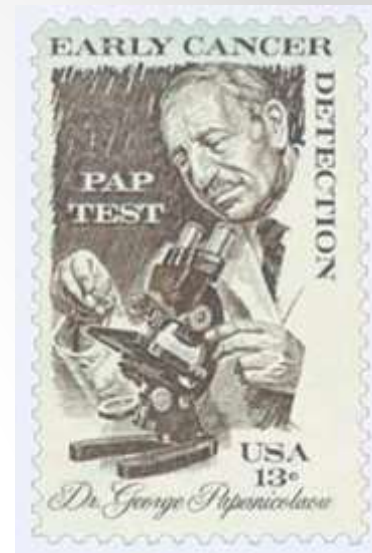
# Riziko vzniku onemocnění po incidentní infekci dle typu HPV



Převzato a upraveno Khan a spol., 2005

# SCREENING KDH $\approx$ cytologie x HPV test

- **Cytologie** - Pap-test
  - až 80% pokles incidence a mortality KDH v organizovaném screeningu
  - ✓ vyšší specificita, levná metoda
  - ✓ nízká citlivost  $\sim 60\%$ , subjektivní test, nutné zaškolení
- **LBC** - cytologie v tenké vrstvě, 90. léta
  - není lepší než Pap-test v detekci KDH
  - méně neadekvátních odběrů a čtení, možnost dalších testů
- **HPV test**
  - ✓ vysoká citlivost  $\sim 94\%$  pro detekci onemocnění, nižší specificita
  - ✓ reprodukovatelnost, možnost automatizace, objektivnost
  - ✓ dražší



# HPV test - přínos

- HR HPV test má **větší citlivost** než cytologie v primárním screeningu v detekci HGL (Mayrand a spol., 2007; Nanda a spol., 2000)
- negativní HR HPV test **vyšší NPV** pro  $\geq$ CIN3 než negativní Pap → prodloužení intervalů (Gage a spol., 2014) → **bude levnější**
- redukce regionálních rozdílů ve screeningu – možnost „**samoodběru**“ **vzorků**, lepší pokrytí populace (Arbyn a spol., 2014)
- větší efektivita v **detekci prekursorů adenokarcinomů** – HPV 18, endocervix (Adegoke a spol., 2012; Ronco a spol., 2014; Sasieni a spol., 2009)

**HPV test v době vakcinace** - očekávaná redukce prevalence lézí → pokles senzitivity, specificity a PPV cytologie

- sledování účinnosti vakcín (trvání protekce, zkřížená protekce, prevalence nevakcinálních typů HPV v populaci)



# SCREENING KDH

Papillomavirus Research 1 (2015) 22–31



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Papillomavirus Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/pvr](http://www.elsevier.com/locate/pvr)



## European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination



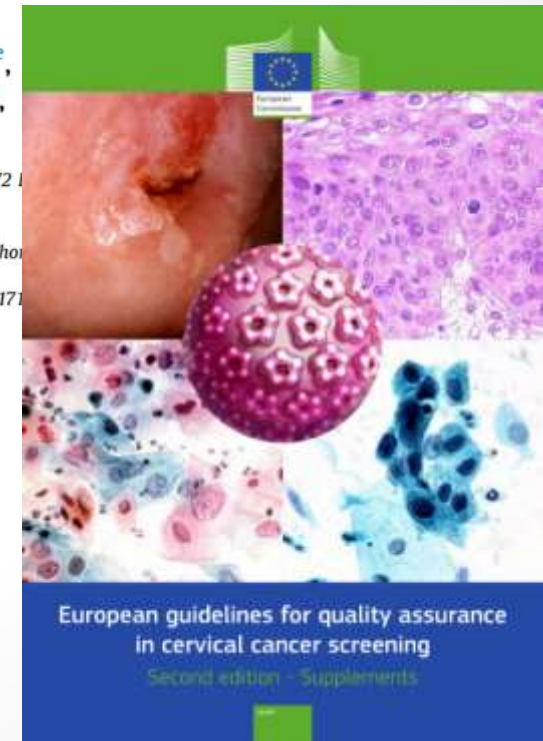
Lawrence von Karsa<sup>a,\*</sup>, Marc Arbyn<sup>b</sup>, Hugo De Vuyst<sup>c</sup>, Joakim Dillner<sup>d</sup>, Lena Dillner<sup>e</sup>,  
Silvia Franceschi<sup>f</sup>, Julietta Patnick<sup>g</sup>, Guglielmo Ronco<sup>h</sup>, Nereo Segnan<sup>h</sup>, Eero Suonio<sup>a</sup>,  
Sven Törnberg<sup>i</sup>, Ahti Anttila<sup>j</sup>

<sup>a</sup> Quality Assurance Group, Section of Early Detection and Prevention, International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France

<sup>b</sup> Belgian Cancer Centre / Unit of Cancer Epidemiology, Scientific Institute of Public Health, J. Wytsmanstraat 14, 1050 Brussels, Belgium

<sup>c</sup> Prevention and Implementation Group, Section of Early Detection and Prevention International Agency for Research on Cancer, 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France

<sup>d</sup> Department of Laboratory Medicine and the Department of Medical Epidemiology and Biostatistics, Huddinge campus F56, Karolinska Institutet, 171 76 Stockholm, Sweden



# HPV test



## **Analytická citlivost** (~detekční limit testu)

- ❑ testy pro epidemiologické studie, sledování účinnosti implementace vakcinačních programů
- ❑ specifické diagnostické využití (např. HPV u mužů, přenos mezi páry...)

## **Klinická citlivost** (~proporce pozitivních vzorků s onemocněním)

- ❑ odvozena od analytické citlivosti, ovlivněna počtem stanovovaných typů HPV, přítomností subtypů, variant event. mutací, sledovanou populací



Cílem detekce HPV u žen/mužů není identifikace všech HPV infekcí, ale **detekce klinicky významných HPV infekcí.**

# HPV test




Vaccine 30S (2012) F100–F106

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

 **Vaccine** 

*Journal of Clinical Virology* 76 (2016) S3–S13

Contents lists available at ScienceDirect

 **Journal of Clinical Virology** 


journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jcv](http://www.elsevier.com/locate/jcv)

Review

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

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

*Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia*



Review  
Nucleic Acid Te  
Mario Poljak<sup>a,\*</sup>, Jaci  
<sup>a</sup> Institute of Microbiology and Im  
<sup>b</sup> Centre for Cancer Prevention, W  
<sup>c</sup> Institute for Medical Virology an  
<sup>d</sup> Departments of Laboratory Med  
<sup>e</sup> Unit of Cancer Epidemiology, Sci

193 testů + 127 variant testů na trhu – 47% Evropa, 18% USA

With such an exceptionally high number of commercial HPV tests on the market, alpha-HPVs are currently still among most attractive microbial targets for molecular diagnostic companies. Unfortunately, today's HPV test global market is one of the most confusing and least regulated, and with most divergent diagnostic products on the market, sometimes colloquially described as the "Wild West." In addition, we can predict with high certainty that

# HPV test

## FDA USA:

- Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test (Digene, Qiagen)(2003)
- Cervista™ HPV HR (Hologic)(2009)  
Cervista™ HPV 16/18 (Hologic)(2009)
- cobas® 4800 HPV Test (Roche Molecular Systems)(2011)
- Aptima HPV assay (Gen-Probe, Hologic)(2011)



CE-IVD – značka pro evropský trh

## Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening?

M. Arbyn<sup>1</sup>, P. J. F. Snijders<sup>2</sup>, C. J. L. M. Meijer<sup>2</sup>, J. Berkhof<sup>3</sup>, K. Cuschieri<sup>4</sup>, B. J. Kocjan<sup>5</sup> and M. Poljak<sup>5</sup>

1) Unit of Cancer Epidemiology and Belgian Cancer Centre, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium, 2) Department of Pathology, 3) Department of Clinical Epidemiology and Biostatistics, VU University Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands, 4) Scottish HPV Reference Laboratory, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK and 5) Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

**TABLE I. Characteristics of hrHPV tests validated using cross-sectional equivalence performance criteria**

hrHPV assay	Nucleic acid targeted	Type of amplification	Genes targeted
<i>Standard comparator tests</i>			
* HC2	DNA	Signal	Whole viral
* GP5+/6+ PCR-EIA			
<i>HPV assays validated according to the Meijer protocol</i>			
1 APTIMA HPV assay [26]			
2 Abbott RealTime High Risk HPV test [20]			
3 BD Onclarity HPV assay [30]			
4 Cervista HPV HR Test [27,28]			
5 cobas 4800 HPV test [23,24]			
6 qPCR(E6/E7) [25]			
7 HPV-Risk assay [29]			
8 PapilloCheck HPV-screening test [19]			
<i>HPV assays assessed in cross-sectional studies in</i>			
1 GP5+/6+-LMNX [41]			
2 careHPV Test [38]			
3 MALDI-TOF [40]			
4 Pretect HPV-Proofer [55]			

*Int. J. Cancer: 124, 516–520 (2009)*  
© 2008 Wiley-Liss, Inc.

**FAST TRACK**

**Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older**

Chris J.L.M. Meijer<sup>1\*</sup>, Johannes Berkhof<sup>2</sup>, Philip E. Castle<sup>3</sup>, Albertus T. Hesselink<sup>1</sup>, Eduardo L. Franco<sup>4</sup>, Guglielmo Ronco<sup>5</sup>, Marc Arbyn<sup>6,7</sup>, F. Xavier Bosch<sup>8</sup>, Jack Cuzick<sup>9</sup>, Joakim Dillner<sup>10</sup>, Daniëlle A.M. Heideman<sup>1</sup> and Peter J.F. Snijders<sup>1</sup>

Journal of Clinical Virology 76 (2016) 514–521

Contents lists available at ScienceDirect

**Journal of Clinical Virology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jcv](http://www.elsevier.com/locate/jcv)

ELSEVIER

**Review**

**VALGENT: A protocol for clinical validation of human papillomavirus assays**

Marc Arbyn<sup>a,\*</sup>, Christophe Depuydt<sup>b</sup>, Ina Benoy<sup>b</sup>, Johannes Bogers<sup>b</sup>, Kate Cuschieri<sup>c</sup>, Markus Schmitt<sup>d</sup>, Michael Pawlita<sup>d</sup>, Daan Geraets<sup>e</sup>, Isabelle Heard<sup>f</sup>, Tarik Gheit<sup>g</sup>, Massimo Tommasino<sup>g</sup>, Mario Poljak<sup>h</sup>, Jesper Bonde<sup>i</sup>, Wim Quint<sup>e</sup>

KNA target E7/E7

CrossMark

## Primární screening

společně s cytologií či jako jediný test

2017 Holandsko, Švédsko

2016 – 18 Itálie

2017 USA (FDA povolení)

2017 Austrálie

## Triážový test

atypické cytologické nálezy  
HPV-pozitivní ve screeningu

Typizace HPV16/18

Detekce virové mRNA E6/E7

Markery p16/Ki-67

Epigenetické markery - metylace

Detekce E6/E7 proteinu

## Sledování

úspěšnost léčby

## HPV test

Karcinom  
anu

Karcinom  
penisu

Karcinomy  
vulvy a  
vaginy

Karcinomy  
hlavy a krku

Diferenciální  
diagnostika



## Nejsou klinicky validovány žádné HPV testy

určení HPV statutu by mělo být klinicky relevantní v kontextu prognózy pacienta či volby odlišné léčby

# DIAGNOSTIKA HPV

**Odběr vzorku** – gynekolog, urolog, dermatovenerolog, proktolog  
vhodný odběrový nástroj, transportní médium

## Typ biologického materiálu

- ✓ stěr léze – klinická relevance, možnost falešné positivity (kontaminace z okolí)
- ✓ probatorní biopsie – kožní útvary, RLP, anogenitální bradavice..
- ✓ FFPE – fragmentace NK, stáří materiálu – výběr vhodných testů
- ✓ výplach dutiny ústní

## Volba diagnostického testu

- ✓ spektrum genotypů – LR typy, kožní typy HPV...

## Interpretace výsledku

# PŘÍMÝ PRŮKAZ HPV

## **DNA**

*In situ* hybridizace

**Amplifikace signálu** – hybridizace v roztoku

**Amplifikace genomu** - PCR – degenerované či obecné primery gen L1, E1, E7

detekce produktů PCR (el-fo, RFLP, hybridizace, sekvenace, qPCR, microarray..)

Luminex technologie

## **mRNA E6/E7**

*In situ* hybridizace

**TMA** technologie  
**NASBA** technologie

## **Další markery**

Proteiny E6/E7 – ELISA, WB  
Methylace virové DNA aj.



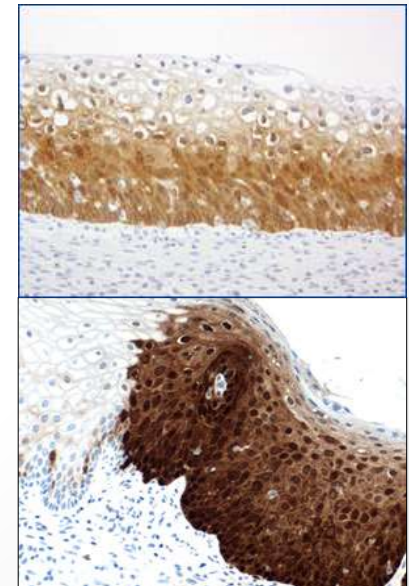
# NEPŘÍMÝ PRŮKAZ INFEKCE

**Stanovení anti-HPV Abs po přirozené infekci NENÍ diagnostickým testem!!**  
prokazuje minulou i současnou infekci, nejistá lokalizace infekce

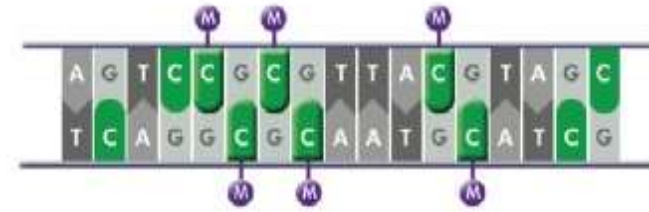
Prognostický význam detekce **anti-E6/E7 HPV16 Abs**  
u karcinomů orofaryngu

## DALŠÍ MARKERY HPV INFEKCE

- **p16<sup>INK4a</sup> antigen (CDKI)**, duální barvení **p16/Ki-67**  
exprese v buňkách schopných proliferace  
deregulace *E6/E7* → ↑ exprese p16  
korelace se závažností lézí (Tsoumpou a spol., 2009)  
nutno nastavit QA

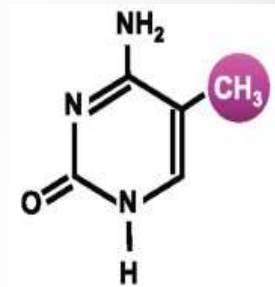


# DALŠÍ MARKERY HPV INFEKCE



- **Metylace** – diferenciace bb, obrana bb proti cizorodé NK, CpG pozice
- **virová DNA** – nekonzistentní výsledky, asociace se závažností dg prokázána pouze pro určité CpG pozice v genu *L1* a *L2* typů HPV 16, 18
- **buněčná DNA** – E6/E7 aktivace DNA-metyltransferázy  
→ potlačení transkripce TSG

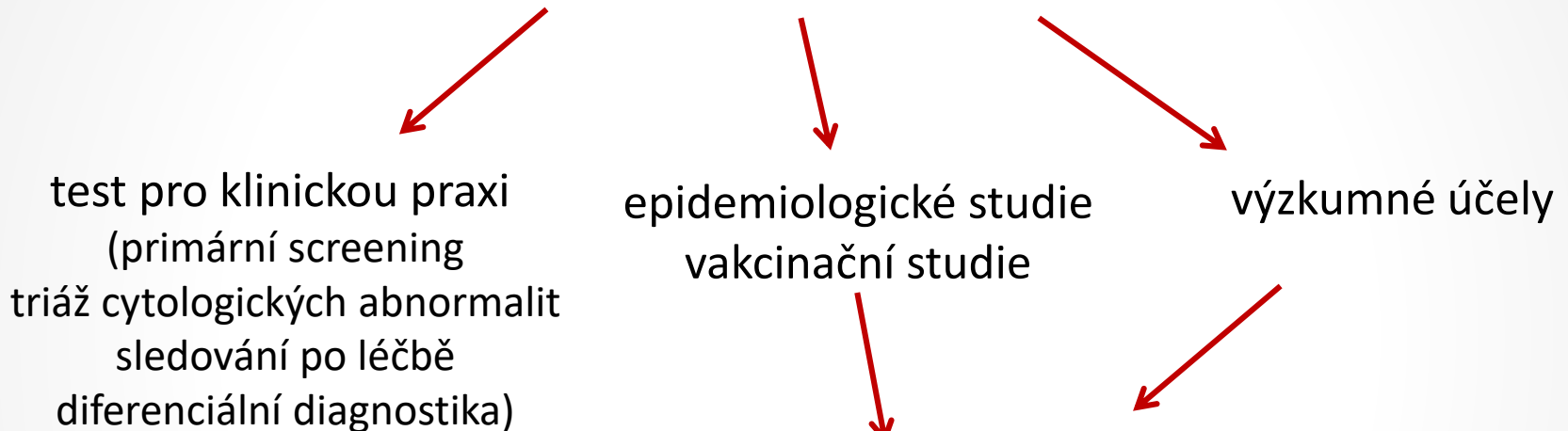
*CADM1*, *MAL*, *mir124-2*, *FAM19A4* (Bierkens a spol., 2013; De Stoooper a spol., 2014)  
asociace se stupněm i délkou persistence CIN2/3  
CpG HPV16/18/31/33 *L1* a *EPB41L3* (Lorincz a spol., 2016) a další



- **Další testy**
- indukce aberantní S-fáze (MCM2, TOP2A barvení), chromozomální aberace, mutace genu *PIK3CA*, *hTERT*, *miRNAs*, integrace viru....  
nejsou dostatečně klinicky validovány  
technicky obtížné pro rutinní zavedení

# HPV TEST - SHRNU TÍ

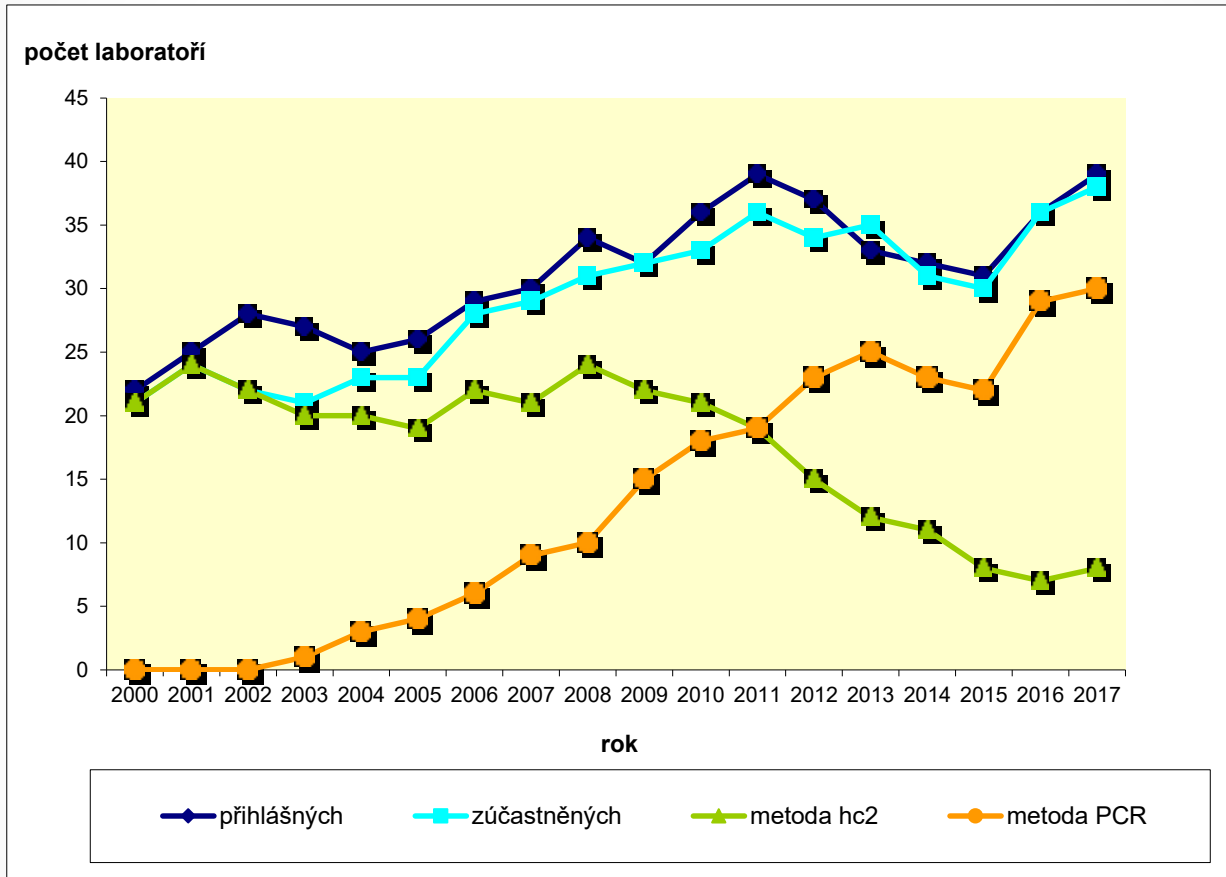
spektrum detekovaných HPV genotypů  
analytická/klinická citlivost



[www.who.int](http://www.who.int)

# EXTERNÍ HODNOCENÍ KVALITY

# EHK - DETEKCE PAPILOMAVIRŮ PT#M/31



AP CEM SZÚ – 1x ročně

# EHK 987 - DETEKCE PAPILOMAVIRŮ

	VZOREK č.1		VZOREK č.2		VZOREK č.3		VZOREK č.4		VZOREK č.5	
	LR	HR	LR	HR	LR	HR	LR	HR	LR	HR
<b>hc2</b>	NEG	NEG	NEG	POZ	POZ	POZ	NEG	POZ	NEG	POZ
<b>PCR</b>	NEG	NEG	NEG	POZ	POZ	POZ	NEG	POZ/ NEG	NEG	POZ
<b>HPV typ</b>	NEG	NEG	NEG	HPV 16	HPV 6	HPV 33	NEG	HPV 58/ NEG	NEG	HPV 18

Série 5 vzorků – simulují klinické vzorky pro stanovení přítomnosti event. typu HPV

**LYOFILIZACE** → rozpuštění v 1 ml média dle detekční metody

# EHK 987 - DETEKCE PAPILOMAVIRŮ

37 laboratoří (4 lab více metod)

METODA DETEKCE	POČET VÝSLEDKOVÝCH LISTŮ (n)	10 bodů	9 bodů	8 bodů	nehodnoceno
AMPLIFIKACE SIGNÁLU	8	8	-	-	-
AMPLIFIKACE NK	34	30	-	4	-
<b>CELKEM</b>	<b>42</b>	<b>38</b>	-	-	-

Celkem **42/42 (100%)** úspěšných výsledků po opravách

<http://www.papillomavirus.cz>



• Děkují za pozornost •