

HPV-testing som sekundærscreening i Norge

Evaluering av prøveperiode 01.07. 2005 - 31.03. 2007.

HPV-testing som sekundærscreening i Norge

Evaluering av prøveperiode 01.07. 2005 - 31.03. 2007.

Rapport utarbeidet av en faggruppe på oppdrag fra Rådgivningsgruppen i Masseundersøkelsen mot livmorhalskreft på oppfordring fra Sosial- og helsedirektoratet.

Januar 2008

Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse	2
Innledning.....	8
Bakgrunn:	8
Sammensetning av faggruppen og mandat.....	10
Arbeidsform	10
Humant papillomavirus	10
Generelt	10
Klassifikasjon og molekylærbiologi.....	11
Diagnostikk	12
Validering.....	13
HPV-tester som er i bruk i Norge.....	14
Hybrid Capture II (Digene)	14
PreTect HPV- Proofer (Norchip AS).....	14
Amplicor (Roche)	15
Pap Type 13 HPV-test (Telelab AS)	15
Inform HPV III (Ventana)	15
Nyere molekylære metoder	16
Screening	16
Generelt	16
HPV-testing i screening	17
Resultat av spørreundersøkelsen sendt ut til laboratoriene	18
Data fra HPV- registeret.....	18
Preliminære resultater fra Ahus studien	22
Diskusjon.....	23
Anbefalinger.....	25

Sammendrag

Mandat:

1. Metodeevaluering. Vurdere om de HPV-testene som er i bruk i screeningprogrammet i dag er standardiserte og validerte (jfr. kapittel 4.1 i Kvalitetsmanualen).
2. Vurdere om anbefalingene for HPV-testing i screening, gjeldende fra 1.7.2005 følges (jfr. Kapittel 4.2 i Kvalitetsmanualen). Data fra HPV-registeret på Kreftregisteret innhentes.
3. Vurdere om det er grunnlag for å stoppe prøveprosjektet med HPV-testing som sekundærscreening i Norge.

Utredningen bør munne ut i en faglig anbefaling til Rådgivningsgruppen, som vil vurdere arbeidet og videresende anbefalingene til Sosial- og helsedirektoratet og Helse- og omsorgsdepartementet. Faggruppen kan ved behov innhente informasjon fra Kunnskapssenteret som på oppdrag fra Sosial- og helsedirektoratet skal levere to rapporter om HPV DNA- og HPV RNA-tester.

HPV-tester som er i bruk i Norge

Hybrid Capture II (Digene)

Testen er CE merket for IVD bruk for deteksjon av HPV i cytologiske prøver og FDA godkjent for:

1. Primærscreening sammen med cytologi for kvinner >30 år
2. Sekundærscreening ved påvist ASC-US (ingen aldersgrense).

Hybrid Capture II (HCII) er en DNA-test basert på hybridisering av viralt DNA til RNA prober. I motsetning til de fleste andre DNA og RNA baserte metoder, inngår det ikke amplifiseringstrinn, noe som gjør testen rask og mindre forbundet med kontaminasjon sammenliknet med amplifikasjonsbaserte metoder. Testen gir enten positivt eller negativt resultat, ingen genotyping.

Siden HCII mangler intern kontroll på DNA kvalitet, foreligger risiko for falske negative (FN) resultat. Falske positive (FP) resultat er dokumentert i flere studier, det skyldes kryssreaktivitet med lavrisiko eller ikke klassifiserte genotyper (10-12). HCII påviser til sammen 18 ulike HPV-typer; det foreligger et kit som detekterer fem lavrisiko HPV-typer (6,11,42,43 og 44) og et kit som detekterer 13 høyrisiko(hr) HPV-typer (16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68). I Norge er det bare høyrisiko kittet som brukes. Siden denne testen ikke diskriminerer mellom de ulike hrHPV genotypene må testen suppleres med genotypetester for å påvise persisterende infeksjon. Det foreligger en omfattende internasjonal klinisk utprøving av DNA-testing, dels som randomiserte studier, både i primær- og sekundærscreening (14). HCII inngår i de største randomiserte studiene som er gjennomført i Europa og USA. I Norge bruker tre laboratorier denne testen.

PreTect HPV- Proofer (Norchip AS)

Testen er CE-merket for IVD bruk. Dette er en RNA-test basert på amplifikasjon av viralt mRNA ved hjelp av en real-time mRNA amplifikasjonsteknologi (multiplex NASBA). Testen påviser full-lengde E6/E7 mRNA transkripter fra fem hrHPV-typer (16,18,31, 33 og 45). Påvisning av cellulært mRNA (U1A) inngår som intern kontroll på RNA kvalitet. Publiserte norske studier har vist at Proofer er positiv hos 3 % av kvinner > 30 år med normal cytologi, hos 77 % av kvinner med histologisk verifisert CIN 2+ og hos 89 % av kvinner med

cervixcarcinom, altså lavere enn påvist med DNA-baserte metoder. Testen er klinisk validert mot HCII med histologi som gullstandard i en tverrsnittsstudie. Det er en mangel at testen ikke påviser alle sikre hrHPV-genotyper, og det foreligger svært lite klinisk dokumentasjon på testens prediktive verdi for påvisning av CIN2 versus CIN3+. Denne testen bør derfor brukes sammen med en annen klinisk validert metode i forsøksperioden. Fem laboratorier i Norge bruker denne testen; fire av disse uten støtte av andre tester.

Amplicolor (Roche)

Testen er CE merket for IVD bruk og under utredning for godkjenning av FDA for samme formål som HCII testen. Dette er en DNA test basert på amplifikasjon av et konservert område av L1 genen ved hjelp av multipleks PCR og deteksjon av PCR produktet ved enzybasert hybridisering i mikrotiterplater. Påvisning av genen for cellulært Beta-globin inngår som intern kontroll på DNA kvalitet. Testen påviser de samme 13 hrHPV- typene som inngår i HCII, og gir i likhet med HCII ingen genotyping. Nedre deteksjonsgrense er oppgitt til 100-240 viruskopier per reaksjon. Amplicolor er teknisk og klinisk validert mot HCII (27-30) og viser høyere analytisk og klinisk sensitivitet. Testens yteevne kan sammenliknes med tilsvarende PCR-baserte metoder referert i Kunnskapssenterets metodeevaluerings rapport. Fire laboratorier i Norge bruker denne testen.

Pap Type 13 HPV-test (Telelab AS)

Testen er en "in-house" metode utviklet ved Telelab AS og CE merket for IVD bruk. Dette er en DNA-test basert på amplifikasjon av et konservert område av L1 genen med multipleks PCR og deteksjon av PCR produktet ved enzybasert hybridisering og mulighet for genotyping med revers line blot. Testen kan benyttes til genotyping og tillater derfor påvisning av persisterende infeksjon, ved gjentatt testing. Testen påviser 13 hrHPV-typer (16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68), to lavrisikotyper (6 og 11) og HPV X (som ikke genotypes). Nedre deteksjonsgrensen er oppgitt til 100 viruskopier per prøve for 11 av hrHPV-typene, noe lavere for HPV 52 og 68 (1000 viruskopier). Det foreligger ingen publiserte kliniske studier der testen er validert opp mot HCII eller histologi, men testens yteevne kan sammenliknes med tilsvarende PCR baserte metoder referert i Kunnskapssenterets metodeevalueringsrapport. Testen utføres kun ved Telelab AS.

Inform HPV III (Ventana)

Dette er en DNA test basert på chromogen in situ hybridiseringsteknikk (CISH). Den er CE merket for IVD bruk. Testen detekterer celler med episomalt eller integrert HPV av typene 16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 66. Dette er eneste HPV-test der morfologi og HPV-positivitet kan vurderes sammen. Genotyping er ikke mulig med denne testen. Testen er validert med hensyn på analytisk sensitivitet, men i svært liten grad klinisk validert (31-33). Den inngår derfor ikke i Kunnskapssenterets metodeevaluering. Kun ett laboratorium bruker denne testen.

De fem HPV-testene som er i bruk i Norge i dag i screeningsammenheng er standardiserte, teknisk validerte og CE-merket etter IVD-direktiv.

Resultat av spørreundersøkelsen sendt ut til laboratoriene

29.1.2007 sendte Kreftregisteret ut brev til laboratoriene med spørsmål om bruk av HPV-tester, og om de nasjonale retningslinjene for HPV-testing fra 1.7. 2005 blir fulgt.

I alt 35 laboratorier leverte skriftlige svar. HPV-testing utføres ved til sammen 13 laboratorier; Syv offentlige patologi-laboratorier, fire offentlige mikrobiologi- laboratorier og to private (Norchip AS og Telelab AS). I alt fem ulike tester er i bruk. Proofer (Norchip AS)

brukes av fem laboratorier, Amplicor (Roche) av fire, HCII (Digene) av tre, Inform HPV III (Ventana) av ett og "in-house" PCR (PAP13), av ett.

Ahus startet opp en 5-årig prospektiv studie 1.1.2005 i samarbeid med Kreftregisteret, der tre kommersielle HPV-tester evalueres (omtales i eget kapittel).

Det rapporteres svært varierende svartider for cytologi med HPV-test; gjennomsnittlig svartid ligger på 3-37 dager. Seks patologilaboratorier svarer at det gjøres avvik fra de nasjonale retningslinjene pga:

1. Klinisk indikasjon (kontroll etter konisering, diskrepans mellom cytologi- og histologidiagnoser, kondylom eller positiv cytologi hos kvinner < 25 år).
2. Logistikk; HPV-analysen gjøres før patologi-laboratoriet får vurdert om siste cytologi gir indikasjon for HPV-test.

Data fra HPV-registeret

Fra 1.7.2005 ble all HPV-testing i Norge meldepliktig iht. Kreftregisterforskriften. HPV-testing som gjøres utenom de nasjonale retningslinjene registreres også. Per 31.3.2007 anser Kreftregisteret å ha komplette data. I denne presentasjonen utelukkes data fra Ahus som gjør en prospektiv 5-årig studie med evaluering av tre nyere kommersielle HPV-tester. Preliminære resultater fra denne studien presenteres i senere kapittel.

I alt 16582 kvinner er HPV-testet. Det er utført til sammen 19170 HPV-tester, 66 % er negative, 32 % positive og 2 % uegnet.

To laboratorier utfører til sammen 59 % av HPV-testene i Norge. Ett av disse har ikke tilgang til alle morfologiske diagnoser og bryter derfor forutsetning om klinisk indikasjon for HPV-testing. Cytologi- og HPV-analysene blir derfor ikke alltid samordnet ved rapportering til rekvirentene.

I alt 8051 (49 %) av HPV-tester tas innenfor de nasjonale retningslinjene. De resterende 7827 (47 %) er tatt uten morfologisk indikasjon, dvs. cytologi mangler, er normal eller høygradig. 1722 (10 %) av HPV-testene er tatt utenfor aldersindikasjon (dvs. < 25 år eller > 70 år.).

Tidsutviklingen for andel som følger de nasjonale retningslinjene viser en jevn økning fra 27 % som fulgte retningslinjene i første kvartal mot 57 % i siste kvartal. Det er de fem laboratoriene med flest antall HPV-analyser som i minst grad følger de nasjonale retningslinjene.

HPV-prevalens med de ulike metodene som brukes i Norge i dag ved uegnet, ASC-US eller LSIL cytologi i aldersgruppen 25-69 år, er vist i tabellen under. Den viser at de mest sensitive PCR teknikkene (Amplicor og PAP13) gir høyest prevalens, fulgt av HCII, Ventana og Proofer

HPV prevalens ved uegnet, ASC-US og LSIL, med de ulike metoder som brukes i Norge i dag. Triage 25-69 år.

Metode	Negativ (%)	Positiv (%)	Total N (%)
HCII	63,2	36,7	3608 (44,7)
PreTect*	76,3	18,8	2436 (30,2)
Amplicor	54,4	45,5	1199 (14,9)
PAP13	50,9	49,1	554 (6,9)
Ventana	76,4	20,7	276 (3,4)

*PreTect=Proofer

Årsaken til den store forskjellen i andel positive HPV-prøver i triage slik det fremgår av tabellen er usikker, fordi bare 53 % av disse (1404/2656) er kontrollert med histologi. Data er innhentet fra alle relevante databaser i Kreftregisteret (Histologiregisteret, CIN-registeret og Hoveddatabasen).

Det er ingen vesentlige forskjeller i forekomst av histologisk verifisert CIN 2+ i triage gruppen mellom de ulike testene.

Triage. Andel som har histologisk verifisert CIN 2+ blant de med positiv HPV-test

Positiv HPV-test	Histologisk verifisert CIN2+%
Proofer	57 %
HCII	53 %
Ventana	52%
Amplicor	49%
PAP 13	44%

Blant prøvene i triage varierer cytologidiagnosene betydelig mellom de ulike laboratoriene; uegnet cytologi varierer fra 1,9- 28,1 %, ASC-US varierer fra 45,2-73,6 % og LSIL fra 18,2- 50,3 %. I triage har 10,8 % av de med uegnet cytologi positiv HPV-test, 28,8 % av de med ASC-US og 51,9 % av de med LSIL.

Av de som har CIN 2+ histologi og negativ HPV-test (n=87) utgjør HPV-Proofer 64 % av disse, mens HCII står for 29 %.

Konklusjon:

Ad punkter i mandatet:

1. Metodeevaluering. I Europa gjelder EU direktivet for *in vitro* diagnostisk medisinsk utstyr (IVD-direktivet) som gir retningslinjer for CE-merking. Dokumentasjonen omfatter testens formål, sensitivitet, spesifisitet, reproduserbarhet, repeterbarhet, sporbarhet og dokumentasjon av kvalitetssystem for produksjon. De fem HPV-testene som er i bruk i Norge i dag i screeningsammenheng er standardiserte, teknisk validerte og CE-merket etter IVD-direktiv.
2. Følges anbefalingene? Det er betydelige avvik når det gjelder bruk av klinisk indikasjon og logistikk som skal sikre at HPV-data samordnes med cytologiske funn. Det var tegn til bedring i den siste del av prosjektet.

3. En av gruppens åtte medlemmer var stemt for å terminere prosjektet umiddelbart. De syv øvrige medlemmer stemte for å forsette prosjektet som planlagt til 1/7 2008 med en påfølgende evaluering.

Det ble ikke oppnådd konsensus. Flertallet besto av fire personer som med formannens dobbeltstemme ga fem stemmer. En dissenterte ut fra det prinsipale syn at prøveprosjektet burde stoppes, og hvis det skulle fortsette burde visse krav oppfylles (se protokolltilførsel side 32-33). Tre dissenterte vesentlig ut fra innvendinger mot punkt 1 i Anbefalingene (se protokolltilførsel side 33-34).

Innledning

Bakgrunn:

Faglig Rådgivningsgruppe for Masseundersøkelsen mot livmorhalskreft nedsatte i 2002 en arbeidsgruppe som fikk i mandat å lage studieprotokoller for HPV-testing i screening.

Januar 2003: Rådgivningsgruppen oversendte rapporten: "Implementation of HPV-testing to Norwegian Cervical Cancer Screening Programme" med forslag til tre protokoller:

1. Høyrisiko HPV-testing som sekundær screening/triage hos kvinner med uegnet, ASC-US eller LSIL cytologi
2. Høyrisiko HPV-testing i follow-up etter behandling for Cervical intraepitelial neoplasia (CIN)
3. HPV som primærscreening hos kvinner < 35 år.

Protokoll 1 ble utarbeidet for norske forhold, og inkluderte LSIL og uegnet cytologi, i motsetning til internasjonale studier. Dette ble gjort på grunnlag av data fra Kreftregisteret som viste at kvinner med uegnet cytologi har opptil fire ganger økt risiko for høygradig cervixneoplasia (CIN 2+) og at 10 % av kvinner med LSIL får påvist CIN2+ ved histologisk undersøkelse (1;2). Diagnostikk av ASC-US og LSIL har dessuten lav reproduserbarhet og forekomst av disse diagnoser varierer tildels betydelig mellom de 18 laboratoriene som i dag utfører cervixcytologi i Norge. Mellom land, har det også vist seg at den morfologiske vurdering av usikre og lavgradige celleforandringer varierer (3).

Februar 2003: Rapporten ble vurdert i Rådgivningsgruppen, som anbefalte å starte norske studier. Rådgivningsgruppen anså det ikke som mulig å gjennomføre protokoll 1 og 2 som randomiserte studier siden flere laboratorier allerede hadde startet opp med HPV-testing. Det var enighet om at HPV-testing skulle skje på klinisk indikasjon og en burde arbeide for å unngå "villscreening". Protokoll 3 ble diskutert på generelt grunnlag. Den ble ikke anbefalt siden det forelå for lite dokumentasjon av nytteverdi av HPV-testing i primærscreening, og fordi man ønsket å avvete resultatet av igangsatte randomiserte studier med HPV som primærscreening i Europa.

Mars 2003: Etter anbefaling fra Rådgivningsgruppen foreslo Kreftregisteret for Sosial- og helsedirektoratet å starte norske studier med tanke på riktig bruk av HPV-tester.

Mai 2003: I et møte mellom Sosial- og helsedirektoratet og Kreftregisteret, ba Sosial- og helsedirektoratet om en skriftlig redegjørelse av problemstillingen hvor det skulle foreslås konkrete løsninger og prosjekttiltak

Juni 2003: Kreftregisteret redegjorde skriftlig. (Brev av 18.6.2003)

Oktober 2003: Sosial- og helsedirektoratet ville ikke finansiere slike studier eller engasjere seg i hvilke, eller hvor mange laboratorier som skulle få utføre HPV-testingen, og anbefalte nasjonale føringer for bruk av HPV-testing. Sosial- og helsedirektoratet imøtekom ikke anmodning fra Kreftregisteret om å gi retningslinjer for HPV-testing fordi de mente at nytten ikke var tilstrekkelig dokumentert. Føringene ble gitt som endringer i regelverket for refusjon. Sosial- og helsedirektoratet ville heller ikke engasjere seg i utprøving av vannbaserte cytologitester.

Sosial- og helsedirektoratet tok på vegne av Helse- og omsorgsdepartementet kontakt med Krefregisteret for endring/utforming av regelverk for takstbruk. Sosial- og helsedirektoratet sluttet seg til Krefregisterets/Rådgivningsgruppens anbefaling om at takst for bruk av HPV-test skulle knyttes opp til cytologidiagnose og kun utløses når testen er anbefalt av patolog.

April 2004: Sosial- og helsedirektoratet inviterte Krefregisteret og medlemmer av Rådgivningsgruppen til møte for å diskutere saken.

2004/2005: Norsk gynekologisk forening (NGF) anbefalte ikke igangsetting av HPV- testing i ”follow-up” etter konisering før det forelå mere dokumentasjon på nytteverdien av slike undersøkelser. NGF reviderte den nettbaserte faglige veileder for gynekologisk virksomhet, og anbefalte HPV-test i triage ved ASC-US, LSIL og uegnet prøve, forutsatt at det ble benyttet test som var validert for screening. NGF anbefalte at andre tester ble brukt parallelt.

Rådgivningsgruppen anbefalte HPV-test som sekundær screening/triage hos kvinner med uegnet, ASC-US og LSIL cytologi i aldersgruppen 25-69 år. Anbefalingene baserte seg på en rapport fra IARC/WHO i 2004 som konkluderte med at:

1. HPV DNA-testing kan redusere insidens og mortalitet av livmorhalskreft
2. Det er evidens for å ta i bruk HPV DNA-testing som triage
3. Det er nødvendig med mere forskning før HPV-test kan tas i bruk som primærscreening.

Mai 2005: Kvalitetsmanual for Masseundersøkelsen mot livmorhalskreft ble godkjent i Rådgivningsgruppen. Denne gir anbefalinger for HPV-testing med flytskjema for oppfølging i kapittel 4.2. Det ble anbefalt å bruke standardiserte, validerte tester for å kunne sammenligne resultatene mellom ulike regioner, og det ble overlatt til fagmiljøene å velge test.

1.7.2005: Det ble innført takster for HPV-test til bruk i sekundærscreening med merknader om takstbruk. (701k, merknad R2 og R3bb, 871 med merknad F7) (701k som etter kort tid ble halvert fra 600,- til 300,-kr).

Resultat av HPV-testene ble gjort meldepliktig i henhold til Krefregisterforskriften § 1-9, slik at bruken kunne evalueres etter tre år, jfr. brev fra Sosial- og helsedirektoratet til Helse og omsorgsdepartementet 9.5.2005.

Krefregisteret utarbeidet logistikken rundt meldesystemene (IT, databaser etc.).

Juli 2005: Krefregisteret sendte informasjonsbrev til landets gynekologer/fastleger og laboratorier med informasjon om de nye takstene med merknader.

Mai 2006: Krefregisteret sendte nytt informasjonsbrev til alle landets patologiavdelinger med anmodning om å samordne cytologi og HPV-resultatene, og å gi ut samlet svar til rekvirentene med anbefalinger om videre oppfølging. Vedlagt brev med informasjon til rekvirentene.

Desember 2006: Rådgivningsgruppen besluttet, på anbefaling fra Sosial- og helsedirektoratet, å evaluere HPV som sekundærscreeningen før det var gått tre år som opprinnelig anbefalt av Sosial- og helsedirektoratet. Det ble, i utgangspunktet nedsatt en faggruppe med fire medlemmer fra Rådgivningsgruppen som skulle evaluere HPV-testene og bruken av disse i

Norge. Faggruppen ble senere utvidet til åtte medlemmer med en representant fra Norsk forening for gynekologisk onkologi, en epidemiolog, en virolog og en molekylærbiolog.

Sammensetning av faggruppen og mandat

Sammensetningen av faggruppen og mandatet er godkjent av Sosial- og helsedirektoratet.

Faggruppen hadde følgende sammensetning:

Leder av faggruppen: Professor dr.med. Are Dalen, Rådgivningsgruppen, Norsk Forening for Medisinsk Mikrobiologi.

Professor dr.med. Bjørn Hagen, Rådgivningsgruppen, NFGO (Norsk Forum for Gynekologisk Onkologi).

Professor Ole Erik Iversen, Rådgivningsgruppen, Norsk Gynekologisk forening

Professor dr.med. Bjørn Hagmar, Rådgivningsgruppen, Norsk forening for klinisk cytologi.

Professor dr. med Anne Eskild, Kvinneklinikken Ahus, Norsk Epidemiologisk forening.

Forsker, dr. scient. Kirsti Vainio, Virologisk avdeling, Folkehelseinstituttet.

Forsker, dr. scient. Vigdis Lauvrak, Mikrobiologisk avdeling Ahus.

Overlege dr.med. A. Kathrine Lie, Den norske patologforening/Kreftregisteret.

Det har vært to observatører; Spesialrådgiver Bodolf Hareide fra Sosial- og helsedirektoratet og fungerende leder av avdeling for screeningbasert forskning og screeningdatabaser, Rita Steen, overlege dr. med., Kreftregisteret.

Mandat:

1. Metodeevaluering. Vurdere om de HPV-testene som er i bruk i screeningprogrammet i dag er standardiserte og validerte (jfr. kapittel 4.1 i Kvalitetsmanualen).
2. Vurdere om anbefalingene for HPV-testing i screening, gjeldende fra 1.7.2005 følges (jfr. kapittel 4.2 i Kvalitetsmanualen). Data fra HPV-registeret på Kreftregisteret innhentes.
3. Vurdere om det er grunnlag for å stoppe prøveprosjektet med HPV-testing som sekundærskanning i Norge.

Utredningen bør munne ut i en faglig anbefaling til Rådgivningsgruppen, som vil vurdere arbeidet og videresende anbefalingene til Sosial- og helsedirektoratet og Helse og omsorgsdepartementet. Faggruppen kan ved behov innhente informasjon fra Kunnskapssenteret som på oppdrag fra Sosial- og helsedirektoratet skal levere to rapporter om HPV DNA- og HPV RNA-tester.

Arbeidsform

Faggruppen har hatt åtte likeverdige medlemmer og to observatører som har deltatt på noen av møtene. Gruppen har hatt fire møter i 2007 på Kreftregisteret. Alle medlemmene har avgitt skriftlig habilitetserklæring. Kunnskapssenteret deltok på ett av møtene og redegjorde for sitt arbeid med data som viste at HPV DNA-testing er mer sensitiv, men mindre spesifikk enn cytologi både ved primær- og sekundærskanning. Metodeevaluering er fortsatt under arbeid.

Humant papillomavirus (HPV)

Generelt

HPV er den vanligste seksuelt overførbare infeksjon hos kvinner og menn. Det er anslått at opptil 20 % av den generelle befolkningen til enhver tid er smittet, og at over 70 % av seksuelt aktive vil få en HPV-infeksjon en eller annen gang i løpet av livet (4). Etter mer enn

30 års forskning er det nå dokumentert at HPV er en nødvendig, men ikke tilstrekkelig årsak til utvikling av livmorhalskreft (5;6). Persisterende infeksjon med hrHPV, virus integrasjon i det humane genom og en rekke epigenetiske og genetiske forandringer er nødvendig for kreftutvikling (7). HPV smitter hovedsakelig ved vaginalt eller analt samleie. Spredning via blod er ikke dokumentert. Kontaktsmitte og perinatal smitte kan forekomme, men er sjelden. Det er fremdeles flere forhold ved det naturlige forløp av en HPV-infeksjon som ikke er fullstendig kartlagt. Viruset er epiteliotropt, dvs. det må infisere og formere seg i epitelceller i hud og slimhinner. I transformasjonssonen i cervix får virus lett tilgang til basallaget hvor virusets livssyklus starter. Inkubasjonstiden varierer fra en til seks måneder, og klinisk infeksjon med virusproduksjon varer ofte i tre til seks måneder. Definisjon av persisterende infeksjon varierer, men i vaksinstudiene er det definert som påvisning av samme genotype i to påfølgende prøver med 4-6 måneders intervall. Hos ca. 10 % utvikles persisterende infeksjon, og man antar at dette skyldes at immunforsvaret ikke har klart å eliminere virusproduserende celler i basallaget. Mangel på fjerning av infiserte celler over tid, øker faren for utvikling av kreft

Klassifikasjon og molekylærbiologi

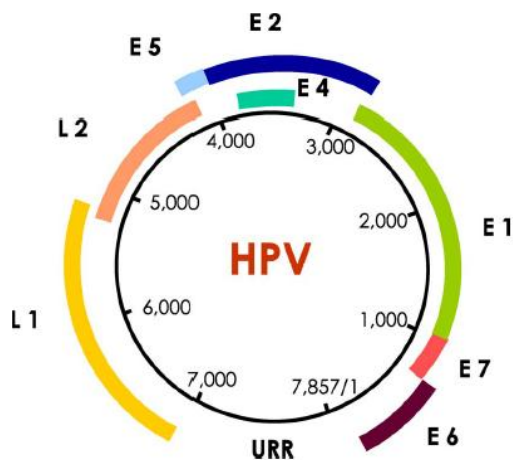
I motsetning til de fleste andre virus kan ikke HPV dyrkes i vevskultur. De blir derfor ikke inndelt i serotyper, men klassifiseres som genotyper etter hvordan DNA-sekvensen er oppbygget. Stadig nye HPV-typer blir klonet og sekvensert. Nå er mer enn 100 genotyper karakterisert, og vel 40 av disse infiserer hud og slimhinner i anogenitalregionen (8). Viruset kan også inndeles i spesifikke undergrupper som gjenspeiler kliniske manifestasjoner, hvilke typer vev viruset formerer seg i og risiko for kreftutvikling. HPV-typer som hovedsaklig infiserer slimhinner, representerer den største subgruppen. Epidemiologiske studier har gitt grunnlag for å inndeles disse i såkalte lavrisiko- og hrHPV-typer, ettersom de er påvist hos kvinner med og uten livmorhalskreft. I 1995 ble HPV 16 og 18 klassifisert som humane carcinogener (kreftfremkallende agens) av International Agency for Research on Cancer (IARC). Nå er det tilstrekkelig dokumentasjon for at til sammen 12 genotyper kan klassifiseres som kreftfremkallende (9) (se tabell 1). Noen genotyper forekommer sjelden hos kvinner med livmorhalskreft, disse blir derfor klassifisert som sannsynlig hrHPV-typer. Lavrisiko HPV-typer påvises hos kvinner uten celleforandringer, eller hos kvinner med kondylomer og lavgradige celleforandringer som går over av seg selv.

Tabell 1 Epidemiologisk klassifikasjon av HPV-genotyper

Gruppe	HPV-type
Høyrisiko	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 og 59
Sannsynlig høyrisiko	26, 53, 66, 68, 73 og 82
Lavrisiko	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108

Viruspartikkelen har en diameter på 55 nm, og består av et dobbeltrådet, sirkulært DNA-molekyl på om lag 8000 basepar, omgitt av en proteinkappe (kapsider). Organiseringen av virusgenomet er ganske lik for de fleste papillomavirus, og deles inn i tre funksjonelle regioner (se figur 1).

Figur 1. HPV-genom



Om lag 10 % av genomet er ikke-kodende (URR = upstream regulatory region). De kodende regionene deles inn i åtte leserammer, som kalles L- og E-gener («late» og «early»). L1- og L2-genene koder for kapsidproteinene som omgir virus-DNA, mens E-genene koder for proteiner som regulerer virusreplikasjon, transkripsjon og transformasjon. E5-, E6- og E7-genene koder for vekststimulerende proteiner som ved overuttrykk fungerer som onkogener. Overuttrykk av E6 og E7 er nødvendig for at kreftutvikling skal finne sted. E6 og E7 griper inn i den normale cellyklusreguleringen ved å blokkere tumorsuppressorgenerne *TP53* og *RB*. Tumorsuppressorgener forhindrer kreftutvikling ved at skadete celler blir reparert eller ødelagt (ved såkalt apoptose, programmert celledød). E6 og E7 blokkerer derfor viktige sjekkpunkter som sikrer at skadete celler blir reparert før de deler seg. Det er bare E6 og E7 fra hrHPV-typer som kan inaktivere og bryte ned tumorsuppressorgener, slik at ukontrollert celledøst og kreftutvikling kan finne sted (7). Selv om påvisning av virus og/eller overuttrykk av E6 og E7 er nødvendig for kreftutvikling, er det usikkert om virus mengde (virus load) i en celleprøve kan relateres til grad av cervixneoplasi og kan brukes som progresjonsmarkør.

Diagnostikk

Siden HPV ikke kan dyrkes i vevskultur, diagnostiseres HPV ved påvisning av virus-DNA, RNA, eller proteiner i det infiserte vevet. Serologi (påvisning av antistoff mot viruset i blod) kan benyttes for å vise gjennomgått virus infeksjon. Som oftest vil det i løpet av få uker med gjennomgått eller pågående HPV-infeksjon dannes antistoffer i serum. IgM og IgA antistoffene forsvinner etter hvert, mens IgG vedvarer i varierende grad, og kan påvises som tegn på gjennomgått infeksjon. Ikke alle infiserte gjennomgår en påvisbar immunrespons. Serologisk testing kan derfor ikke brukes i screening på grunn av for lav sensitivitet, men er nyttig for å evaluere effekt av vaksiner og for å studere det naturlige forløp av HPV-infeksjon. Ingen standardiserte og teknisk eller klinisk validerte serologiske tester finnes foreløpig i markedet. HPV-tester basert på immunhistokjemi kan benyttes for å påvise onkoproteiner og cellyklusproteiner som er overuttrykket ved høyrisiko HPV-infeksjon, og kan således fungere som markør på cervixneoplasi (eks. MCM, CDC6, p16, Ki67). De prediktive verdier av disse testene i screening er ikke dokumentert. Det finnes en rekke DNA- og RNA-baserte molekylærbiologiske teknikker for påvisning av HPV. Foreløpig er det få som er kommersielt tilgjengelig og enda færre som er omfattende klinisk validert.

Validering

- I kapittel 4.1 i Kvalitetsmanualen er det ikke definert hva som menes med en standardisert og validert HPV-test. Diagnostiske tester valideres teknisk og klinisk. Kommersielle tester leveres med CE-merking og standardprosedyrer fra produsent. Kravene til godkjenning av "in house" tester i offentlige laboratorier er omfattende. Kravet om standardisering er oppfylt forutsatt at personalet er kompetent, utstyr er vedlikeholdt og prosedyrer blir fulgt. Kvalitetssikring av dette gjøres stort sett i klinisk virologi ved nasjonale eller internasjonale ringtester som er meget avslørende for mindre gode laboratorierutiner. På kvalitetssikringsområdet er HPV-screeningen mangelfull. I Europa gjelder EU direktivet for *in vitro* diagnostisk medisinsk utstyr (IVD-direktivet) som gir retningslinjer for CE-merking. Dokumentasjonen omfatter testens formål, sensitivitet, spesifisitet, reproduserbarhet, repeterbarhet, sporbarhet og dokumentasjon av kvalitetssystem for produksjon. Det er bred enighet i Europa om at tester for påvisning av mikrobiologiske agens ikke nødvendigvis må gjennomgå store kliniske utprøvinger for å kunne CE-merkes som IVD-produkt. Likevel krever IVD-direktivet at klinisk validering skal kunne dokumenteres og det legges stor vekt på bruk av sammenlikning mot "gullstandarder" dersom dette finnes. For påvisning av forstadier til livmorhalskreft ansees histologi som gullstandard. *In vitro* diagnostikk i mikrobiologiske og patologilaboratorier er i svært liten grad standardisert mht internasjonale standarder. Europa har ikke noe godkjenningsorgan og legger gjennom IVD-direktivet hovedvekt på at produsenten kan fremlegge dokumentasjon på formål og yteevne (teknisk og klinisk validering) ved forespørsel.
- I USA har Food and Drug Administration (FDA) noenlunde samme definisjon av validering og standardisering som i Europa, men andre krav til klinisk utprøving. Finnes det en test godkjent av FDA til et gitt formål (f. eks påvisning av forstadier til livmorhalskreft) skal nye tester med samme formål vurderes opp mot denne, og det legges stor vekt på diagnostisk positiv/negativ prediktiv verdi.
- Ved etablering av "in house" tester ved offentlige laboratorier stilles det detaljerte krav til utstyr, herunder også reagenser, som inngår i analyseplattformen. Konstruksjon, merking, markedsføring mv skal følge lov og forskrift om medisinsk utstyr ([www.Sosial- og Helsedirektoratet.no](http://www.Sosial-og-Helsedirektoratet.no)). Testen skal tilfredsstille krav med hensyn til analytisk sensitivitet, diagnostisk sensitivitet, analytisk spesifisitet, diagnostisk spesifisitet, nøyaktighet, reproduserbarhet, herunder kontroll av kjent, relevant interferens, og påvisningsgrenser. Testene skal tilfredsstille krav for akkreditering og i henhold til de krav og rutiner som til enhver tid gjelder for offentlige laboratorier.
- I løpet av arbeidet har gruppen sett nødvendigheten av å presisere hva som inngår i klinisk validering av HPV diagnostikk i sekundærscreening. Den kliniske validering går i stor grad ut på å bestemme den positive prediktive verdi av testen, dvs. for påvisning av histologisk verifisert CIN2+. Siden genital HPV infeksjon går raskt tilbake hos de fleste (90 % etter 2 år) vil en enkelt påvisning ha lav prediktiv verdi. Teststrategi med målsetning å påvise persisterende infeksjon blir derfor en viktig faktor i den kliniske validering. Sensitiviteten av cervix screening varierer sterkt internasjonalt. Land med lav sensitivitet vil ha mest nytte av HPV-screening, dvs. ha den høyeste positive prediktive verdi. Den negative prediktive verdi (risiko for CIN2+ hos HPV neg) er meget høy forutsatt at testen inkluderer alle de onkogene HPV-typene. Den blir derimot lavere hvis testen kun tar et utvalg.

HPV-tester som er i bruk i Norge

Hybrid Capture II (Digene)

Testen er CE merket for IVD bruk for deteksjon av HPV i cytologiske prøver og FDA godkjent for:

1. Primærscreening sammen med cytologi for kvinner > 30år
2. Sekundærscreening ved påvist ASC-US (ingen aldersgrense).

Hybrid Capture II (HCII) er en DNA test basert på hybridisering av viralt DNA til RNA prober og deteksjon av DNA:RNA hybridet ved hjelp av enzymmerket antistoff. Testen utføres i mikrotiterplater og er automatiserbar. I motsetning til de fleste andre DNA og RNA baserte metoder, inngår det ikke noe amplifiseringstrinn, noe som gjør testen rask og mindre forbundet med kontaminasjon sammenliknet med amplifikasjonsbaserte metoder. Testen gir enten positivt eller negativt resultat, ingen genotyping.

Nedre deteksjonsgrense er 1pg HPV DNA/ml eller 5000 viruskopier per reaksjon (lavere analytisk sensitivitet enn PCR). Siden HCII mangler intern kontroll på DNA kvalitet, foreligger risiko for falske negative (FN) resultat. Falske positive (FP) resultat er dokumentert i flere studier, det skyldes kryssreaktivitet med lavrisiko eller ikke klassifiserte genotyper (10-12). Det er vist at andel FN og FP kan reduseres til hhv 4 % og 6 % dersom grenseverdien økes (13). HCII påviser til sammen 18 ulike HPV-typer; det foreligger et kit som detekterer fem lavrisiko HPV-typer (6,11,42,43 og 44) og et kit som detekterer 13 hrHPV-typer (16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68). I Norge er det bare høyrisiko kittet som brukes. Siden denne testen ikke diskriminerer mellom de ulike hrHPV genotypene må testen suppleres med genotypetester for å påvise persisterende infeksjon. Det foreligger en omfattende klinisk utprøving dels som randomiserte studier, både i primær- og sekundærscreening (14). HCII inngår i de største randomiserte studiene som er gjennomført i Europa og USA (15;16). Denne testen inngår i Kunnskapssenteret metodeevaluering der det konkluderes med at HPV DNA-testing er mere sensitiv, men mindre spesifikk enn cytologi både ved primær- og sekundærscreening (14). En svakhet ved denne rapporten er at det er brukt oversikter i HTA og Cochrane databasene. Enkeltstudier er ikke gjennomgått. Det er derfor usikkert om histologi er brukt som gullstandard i alle studiene. Rapporten konkluderer med at HCII ikke skiller tilstrekkelig mellom syke og friske, og derfor ikke egner seg til primærscreening. Det er foreslått at spesifisiteten er aldersavhengig, men en nyere meta-analyse har ikke kunnet bekrefte at spesifisiteten er høyere hos kvinner > 30 år (17). I Norge bruker tre laboratorier denne testen.

PreTect HPV- Proofer (Norchip AS)

Testen er CE-merket for IVD bruk. Dette er en RNA test basert på amplifikasjon av viralt mRNA ved hjelp av en real-time mRNA amplifikasjonsteknologi (multiplex NASBA). Testen påviser full-lengde E6/E7 mRNA transkripter fra fem hrHPV-typer (16,18,31, 33 og 45). Påvisning av cellulært mRNA (U1A) inngår som intern kontroll på RNA kvalitet. Deteksjonsgrense for HPV 16 E6/E7 i SiHa/CaSci tilsvarer 100 SiHa/CaSci celler i en bakgrunn av 10.000 negative celler. Deteksjonsgrense for HPV 18 E6/E7 i HeLa celler er fem HeLa celler i en bakgrunn på 500.000 negative celler. Det foreligger ti publikasjoner av teknisk og kliniske data i internasjonale medisinske tidsskrift (10;18-26). Publiserte norske studier har vist at Proofer er positiv hos 3 % av kvinner > 30 år med normal cytologi, hos 77 % av kvinner med histologisk verifisert CIN 2+ og hos 89 % av kvinner med cervixcarcinom, altså lavere enn påvist med DNA-baserte metoder (10,21-23). Testen er klinisk validert mot HCII med histologi som gullstandard i en tverrsnittsstudie (10). En norsk

studie har vist at Proofer har tilsvarende sensitivitet og høyere spesifisitet enn consensus PCR i triage (24). Siden testen påviser genotype, vil den derfor kunne benyttes for å undersøke persisterende uttrykk av onkogenet for de genotypene som inngår i testen. Infeksjon kan være tilstede uten at det foreligger detekterbart ekspresjonsnivå for de fem genotypene som inngår i testen. Betydningen av å påvise onkogen ekspresjon fra disse fem genotypene er ikke tilstrekkelig epidemiologisk vurdert. Testen kan ikke sammenliknes med "in-house" PCR, og det foreligger derfor svært lite klinisk dokumentasjon på testens prediktive verdi for påvisning av CIN2 versus CIN3+. Denne testen bør derfor brukes sammen med en annen klinisk validert metode i forsøksperioden. Fem laboratorier i Norge bruker denne testen; fire av disse uten støtte av andre tester.

Amplicolor (Roche)

Testen er CE merket for IVD bruk og under utredning for godkjenning av FDA for samme formål som HCII testen. Dette er en DNA test basert på amplifikasjon av et konservert område av L1 genotet ved hjelp av multipleks PCR og deteksjon av PCR produktet ved enzybasert hybridisering i mikrotiterplater. Påvisning av genotet for cellulært Beta-globin inngår som intern kontroll på DNA kvalitet. Testen påviser de samme 13 hrHPV-typene som inngår i HCII, og gir i likhet med HCII ingen genotyping. Nedre deteksjonsgrense er oppgitt til 100-240 viruskopier per reaksjon. Denne testen har vært kommersielt tilgjengelig siden 2003. Amplicolor er teknisk og klinisk validert mot HCII (27-30) og viser høyere analytisk og klinisk sensitivitet. Testens yteevne kan sammenliknes med tilsvarende PCR-metoder referert i Kunnskapssenterets metodeevaluerings rapport. fire laboratorier i Norge bruker denne testen.

Pap Type 13 HPV-test (Telelab AS)

Testen er en "in-house" metode utviklet ved Telelab AS og CE merket for IVD bruk. Dette er en DNA-test basert på amplifikasjon av et konservert område av L1 genotet med multipleks PCR og deteksjon av PCR produktet ved enzybasert hybridisering og mulighet for genotyping med revers line blot. Testen kan benyttes til genotyping og tillater derfor påvisning av persisterende infeksjon. Testen påviser 13 hrHPV-typer (16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68), to lavrisikotyper (6 og 11) og HPV X (som ikke genotypes). Nedre deteksjonsgrensen er oppgitt til 100 viruskopier per prøve for 11 av hrHPV-typene, noe lavere for HPV 52 og 68 (1000 viruskopier). Det foreligger ingen publiserte kliniske studier der testen er validert opp mot HCII eller histologi, men testens yteevne kan sammenliknes med tilsvarende PCR baserte metoder referert i Kunnskapssenterets metodeevalueringsrapport. Testen utføres kun ved Telelab AS.

Inform HPV III (Ventana)

CE merket for IVD bruk. Dette er en DNA-test basert på chromogen in situ hybridiseringsteknikk (CISH). Testen detekterer celler med episomalt eller integrert HPV av typene 16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 66. Dette er eneste HPV-test der morfologi og HPV positivitet kan vurderes sammen. Genotyping er ikke mulig med denne testen. Deteksjonsgrense er bestemt bare for dyrkede cellelinjer (HeLa: 10-50 viruskopier, SiHa: en viruskopi). Testen er validert med hensyn på analytisk sensitivitet, men i svært liten grad klinisk validert (31-33). Den inngår derfor ikke i Kunnskapssenterets metodeevaluering. Inform HPV III er validert mot HCII ved ASC-US cytologi (33). Av 1000 tilfeller med ASC-US var 20 % positive med HCII og 26 % fikk påvist CIN mot hhv 12 % og 34 % med Inform HPV III. De prediktive verdiene av denne testen i screening er ikke dokumentert. Kun ett laboratorium bruker denne testen.

Nyere molekylære metoder

Det er de siste årene gjort betydelige fremskritt når det gjelder preparering og rensing av nukleinsyrer for gendiagnostikk. Automatisasjon reduserer ”work load”, kostnader og risiko for kontaminering. Totalt sett oppnås bedre produkter. Det forventes flere kommersielt tilgjengelige HPV-tester basert på ny teknologi i løpet av kort tid, som vil bli tatt i bruk i den analytiske delen av HPV diagnostikken. Medprobe har nylig kommersialisert en RNA-basert HPV-test som detekterer E6/E7 mRNA fra 14 hrHPV-typer. En tverrsnittsstudie har vist at denne testen kan være en potensiell biomarkør for deteksjon av høygradige celleforandringer og invasive carcinomer (34). Andre aktuelle metoder er mikromatrise basert og Luminex xMAP (MAP= MultiAnalyte Profiling) baserte.

Teknologi basert på micro array eller mikromatriser består i at en binder korte nukleinsyrebitar (prober) til en egnet overflate (glass eller nitrocellulose). Probene tilsettes i ørsmå dråper. Det er plass til mange tusen spots på et areal tilsvarende et frimerke eller mindre, og testen er derfor egnet til samtidig deteksjon og genotyping. Det er vist at mikromatrise teknikken er anvendelig til påvisning og kvantitering av HPV (35;36) og testen er bl.a. kommersialisert i Sør-Korea. Testen er relativt lett å utføre, og fungerer godt både på RNA og DNA. Siden det dreier seg om få spots på et lite område kan resultatet avleses i et fluorescensmikroskop eller annet profesjonelt avlesningsutstyr.

Luminex xMAP teknologien er basert på polystyren mikrokuler med en diameter på 5,6µm som er farget med opp til 100 ulike blandinger av fluorokrom hvor hver har sin unike fluorescens. Til visualisering benyttes flowcytometrisk prinsipp basert på to laserstråler med ulik bølglengde for avlesning. Den ene for å identifisere reportertermolekylet, og den andre for å identifisere kula. Teknikken egner seg for samtidig påvisning og genotyping av inntil 100 ulike genotyper. En test for påvisning av de mest aktuelle onkogene HPV-typer er utviklet av grupper tilknyttet det tyske kreftforskningssenter (DKFZ) (37). Testen (med 24 genitale HPV typer) er nylig kommersialisert (www.multimetrix.com), men foreløpig ikke CE-merket for IVD-bruk.

Både mikromatrise og luminex teknologien krever avansert utstyr og høyt kvalifisert personale, og vil derfor kun ha potensiell anvendelse til screening i land der dette er kostnadseffektivt og praktisk mulig.

Screening

Generelt

Screening er pr. definisjon et helseforebyggende tiltak for å identifisere preklinisk sykdom hos asymptotiske individer, helst ved hjelp av en relativt enkel test. Formålet med screening er å redusere insidens og mortalitet til pasientene som har den sykdommen man screener med henblikk på. For at screening skal ha noen hensikt må flere forutsetninger være tilstede:

1. Det naturlige forløp må være kjent.
2. Sykdommen må ha en lang preklinisk fase.
3. Behandling av forstadium må gi bedre prognose.

Livmorhalskreft er en av få kreftsykdommer som egner seg for screening. Effekt av livmorhalskreftscreening er avhengig av følgende faktorer:

1. Forekomst av sykdommen.
2. Deltakelse / compliance (blant kvinner i befolkningen og blant helsepersonell)
3. Sensitivitet av testen
4. Effekt av behandlingen.

Økt effekt av cervixcancer screening kan oppnås ved å bedre compliance eller øke sensitiviteten av *testene* (ved f. eks hyppigere testing eller ved bruk av en mere sensitiv test i tillegg til den etablerte test). Data fra Kreftregisteret viser at det har vært en jevn og relativt kraftig stigning i antall rapporterte tilfeller av cervixcancer fram til midten av 1970-årene med et maksimum på 489 tilfeller i 1974. Siden har insidensen vært synkende; i 2004 ble det registrert 269 tilfeller og i 2005 292 tilfeller av cervixcancer. Mortaliteten har også vært fallende siste 10 år fra knapt 150 til 72 i 2005. Dekningsgraden i Norge var i 2002-2005 på 77,7 %. Det er vist at mere enn halvparten av kvinnene som får påvist cervixcancer utgående fra plateepitel, ikke har tatt celleprøve siste 10 år før diagnosen stilles (38). Upubliserte data fra Kreftregisteret viser at 29 % av kvinner som fikk påvist cervixcancer i 2005, har normal cytologi siste 3 år før diagnosen stilles.

HPV-testing i screening

Forskning har vist at HPV-testing kan øke sensitiviteten i screeningprogrammer for livmorhalskreft. Nye molekylære tester kan i tillegg få betydning som progresjonsmarkører for å avgjøre hvilke forstadier som vil utvikles videre til cervixcarcinom (7;39). Det pågår en internasjonal debatt om hvordan HPV-testing best kan inkorporeres i screening:

1. Som primærscreening med eller uten cytologi
2. Som sekundærscreening for utvalgte grupper med uavklart/lavgradig cytologi (triage)
3. I oppfølging etter konisering for høygradige celleforandringer for å påvise persisterende atypi eller residiv

Nyere meta-analyser og Kunnskapssenteret metodeevaluering har vist at HPV DNA-testing er mer sensitiv, men mindre spesifikk enn cytologi både ved primær- og sekundærscreening (14;17;40). Det vil si at HPV DNA-testing fører til at flere kvinner med høygradige celleforandringer oppdages og behandles. HPV DNA-testing har lav spesifisitet; det vil si at det identifiseres kvinner med falsk positiv test som ikke har livmorhalskreft eller forstadier som krever behandling. Dette fører til unødvendig engstelse, unødvendige kontroller og overforbruk av utvidet diagnostikk (kolposkopi og biopsier). I USA er nå HCII godkjent av Food and Drug Administration (FDA) som sekundærscreening ved påvist usikre celleforandringer (ASC-US), og som primærscreening sammen med cytologi hos kvinner eldre enn 30 år. I Europa avventer man resultater fra pågående, randomiserte studier som evaluerer effekt av HPV som primærscreening (41).

Den svenske SWEDESCREEN studien på ca 122.000 kvinner illustrerer minst tre viktige forhold:

1. Genotyping er meget viktig, dels for å definere persisterende infeksjon, dels fordi det er signifikante forskjell i risikoen for progresjon mellom virustypene (HPV 16, 31 og 33 står i særklasse).
2. Spesifisiteten av HPV-testing øker med økende alder hos kvinnene. I en nylig publisert randomisert svensk studie (45) ble det vist at ved 34 års alder er 7,5 % av kvinnene hrHPV positive, hvorav 45 % av disse persisterer etter ett år (45). Det er i denne gruppen praktisk talt alle dysplasier opptretter. Konklusjonen var: ” The addition of an HPV-test to the Pap test to screen women in their mid-30s for cervical cancer

reduces the incidence of grade 2 or 3 cervical intraepithelial neoplasia or cancer detected by subsequent screening examinations”

3. I en nylig publisert kanadisk randomisert studie (44) hvor HPV DNA testing sammen liknes med Pap-test er konklusjonen: “As compared with Pap testing, HPV-testing has greater sensitivity for the detection of cervical intraepithelial neoplasia.”, noe som også har vært vist i tidligere studier. Forfatterne mener funnene taler for at screening intervallene kan forlenges for HPV negative og at funnene taler for bruk av HPV-testing i primærscreening.

Det finnes en rekke ulike tester for påvisning av HPV-infeksjon brukt i forskning, men få er standardisert og kommersielt tilgjengelige, og dermed lite egnet for screening og diagnostikk. Det foreligger ingen nasjonale eller internasjonale randomiserte, populasjonsbaserte studier som sammenlikner de prediktive verdiene av de ulike kommersielle HPV-testene i screening. Det foreligger heller ingen dokumentasjon på ringtesting dvs. reproduserbarhet mellom laboratorier. Det er derfor ennå ikke avklart hvilken HPV-test som er best egnet for screening og diagnostikk. Mandatet til Faggruppen omfatter kun HPV som sekundærscreening (triage), og det er dette som blir diskutert i denne rapporten.

Resultat av spørreundersøkelsen sendt ut til laboratoriene

29.1.2007 sendte Kreftregisteret ut brev til laboratoriene med spørsmål om bruk av HPV-tester og om de nasjonale retningslinjene for HPV-testing fra 1.7.2005 blir fulgt. I alt 35 laboratorier leverte skriftlig svar. HPV-testing utføres ved til sammen 13 laboratorier; syv offentlige patologilaboratorier, fire offentlige mikrobiologiske laboratorier og to private (Norchip AS og Telelab AS). I alt fem ulike tester er i bruk. Disse er omtalt i eget kapittel. Proofer (Norchip AS) brukes av fem laboratorier. Amplicor (Roche) av fire, HCII (Digene) av tre, Inform HPV III (Ventana) av ett og in-house PCR av ett. AHUS startet opp en 5-årig prospektiv studie 1.1.2005 i samarbeid med Kreftregisteret, der tre kommersielle HPV-tester evalueres (omtales i eget kapittel). Det rapporteres svært varierende svartider for cytologi med HPV-test; gjennomsnittlig svartid ligger på 3-37 dager.

Seks patologilaboratorier svarer at det gjøres avvik fra de nasjonale retningslinjene pga:

1. Klinisk indikasjon: kontroll etter konisering, diskrepans mellom cytologi- og histologidiagnoser, kondylom eller positiv cytologi hos kvinner < 25 år.
2. Logistikk: HPV-analysen gjøres før patologilaboratoriet får vurdert om det er indikasjon for HPV-test i siste cytologiske prøve.

Data fra HPV-registeret

Fra 1.7.2005 ble all HPV-testing i Norge meldepliktig med hjemmel i Kreftregisterforskriften. HPV-testing som gjøres utenom de nasjonale retningslinjene registreres også. Per 31.3.2007 anses Kreftregisteret å ha komplette data. I denne presentasjonen utelukkes Ahus data som gjør en prospektiv 5-årig studie med evaluering av tre nyere kommersielle HPV-tester. Preliminære resultater fra denne studien presenteres i neste kapittel.

I alt 16582 kvinner er HPV-testet. Det er utført til sammen 19170 HPV-tester, 66 % er negative, 32 % positive og 2 % uegnet. Antall tester per kvinne er vist i tabell 2.

Tabell 2. Antall HPV-tester per kvinne

	Antall	Prosent
1	14 372	86,7
2	1 877	11,3
3	294	1,8
4	33	0,2
5	6	0,0
Total	16 582	100,0

To laboratorier utfører til sammen 59 % av HPV-testene i Norge. Ett av patologilaboratoriene sender celleprøvene til Norchip AS for HPV-analyse. Dette patologilaboratoriet har ikke tilgang til alle morfologiske diagnoser og bryter derfor forutsetningen om klinisk indikasjon for HPV-testing. Cytologi og HPV analysene blir derfor ikke alltid samordnet ved rapportering til rekvirentene.

Tabell 3. Fordeling av HPV-tester mellom laboratoriene; Ahus er ikke inkludert. Data er anonymisert.

	Lab												
HPV	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	Total
Negativ	3725	4332	835	506	441	670	533	422	351	371	278	188	12652
Positiv	2130	849	782	598	481	146	359	114	162	114	160	211	6106
Uegnet	4	292	2	0	0	79	0	14	7	14	0	0	412
Total	5859	5473	1619	1104	922	895	892	550	520	499	438	399	19170

To av laboratoriene har svært høy andel uegnede prøver (B: 5,4 %; F: 8,8 %) dvs. til sammen 90 % av alle uegnede prøver (371 av 412). Aldersfordelingen viser at 9,8 % av testene gjøres i aldersgruppen < 25 år, 89,5 % i aldersgruppen 25-69 år og 0,6 % hos eldre kvinner (> 70 år). I HPV registeret registreres prøvetakingsdato for HPV-test og dato for besvart cytologi (den første i måned). Tabell 4 viser cytologifunn 2-12 mnd før HPV-test.

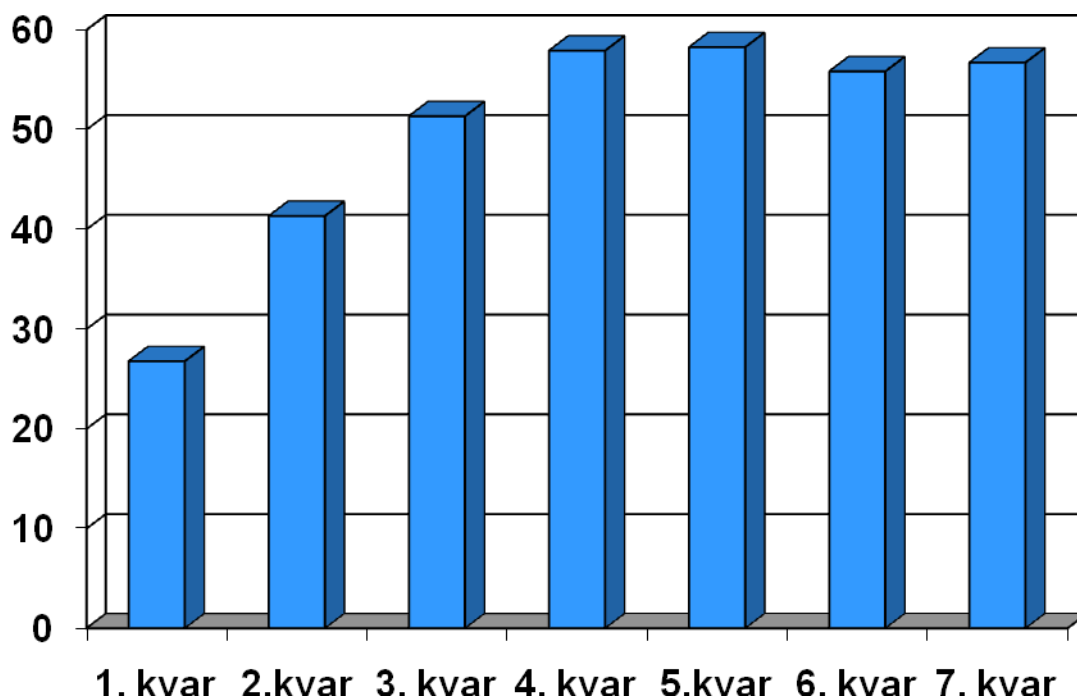
Tabell 4. Cytologifunn 2-12 mnd. før HPV-test (uansett alder)

	Antall	Prosent
Triage - Uegnet, ASC-US, LSIL	8 755	52,8
Ingen prøver	5 976	36,0
Benign	1 258	7,6
En prøve, høygradig+	593	3,6
Total	16 582	100

I alt 8051 (49 %) HPV-tester tas innenfor de nasjonale retningslinjene. 7827 (47 %) av HPV-testene er tatt uten morfologisk indikasjon, dvs. cytologi mangler, er normal eller høygradig. 1722 (10 %) av HPV-testene er tatt utenfor aldersindikasjon (d.v.s. < 25 år eller > 70 år.).

Tidsutviklingen for andel som følger de nasjonale retningslinjene viser en jevn økning fra 27 % som fulgte retningslinjene i 1. kvartal mot 57 % i siste kvartal (figur 2). Det er de fem laboratoriene med flest antall HPV-analyser som i minst grad følger de nasjonale retningslinjene, og som dermed bidrar til å trekke gjennomsnittet ned.

Figur 2. Tidsutvikling: andel som følger de nasjonale retningslinjene fra 1. – 7. kvartal.



HPV prevalens med de ulike metodene som brukes i Norge i dag ved uegnet, ASC-US eller LSIL cytologi i aldersgruppen 25-69 år, er vist i tabell 5. Den viser at de mest sensitive PCR teknikkene har høyest prevalens, fulgt av HCII, Ventana og Proofer.

Tabell 5. HPV prevalens med de ulike metoder som brukes i Norge i dag. Triage 25-69 år.

Metode	Negativ (%)	Positiv (%)	Total N (%)
HCII	63,2	36,7	3608 (44,7)
PreTect*	76,3	18,8	2436 (30,2)
Amplicor	54,4	45,5	1199 (14,9)
PAP13	50,9	49,1	554 (6,9)
Ventana	76,4	20,7	276 (3,4)

*PreTect=Proofer

Årsaken til den store forskjellen i andel positive HPV-tester i triage slik det fremgår av tabell 5 er usikker, fordi bare 53 % av disse (1404/2656) er kontrollert med histologi. Dataene er innhentet fra alle Krefregisterets databaser (Histologiregisteret, CIN registeret og Hoveddatabasen). Histologi er benign eller uegnet hos 28 %, lavgradig hos 16 % og høygradig (CIN2+) hos 57 % hos de med HPV positive prøver. Det er også registrert histologi hos 280 (5 %) med negativ HPV-test i triage gruppen 25-69 år. Av disse har 58 % benign/uegnet histologi, 31 % høygradig histologi og 11 % lavgradig histologi.

Det er ingen vesentlige forskjeller i forekomst av histologisk verifisert CIN 2+ i triage gruppen mellom de ulike metodene (Tabell 6).

Tabell 6. Triage. Andel som har histologisk verifisert CIN 2+ blant de med positiv HPV-test

Positiv HPV-test	Histologisk verifisert CIN % 2+
Proofer	57 %
HCII	53 %
Ventana	52%
Amplicor	49%
PAP 13	44%

Tabell 7. Triage – Index cytologi hos dem som har CIN 2+ og positiv HPV-test (N=756).

Cytologi		Testtype					Total
		HCII	Proofer	Amplicor	Ventana	PAP 13	
Uegnet	N	7	6	1	0	2	16
	%	2,2	3,4	0,6	0,0	2,9	2,1
ASC-US	N	156	96	80	8	22	362
	%	49,7	53,9	45,7	40,0	31,9	47,9
LSIL	N	151	76	94	12	45	378
	%	48,1	42,7	53,7	60,0	65,2	50,0
Total	N	314	178	175	20	69	756

Blant cytologiprøvene i triage varierer diagnosene mellom de ulike laboratoriene; uegnet cytologi varierer fra 1,9- 28,1 %, ASC-US varierer fra 45,2-73,6 og LSIL fra 18,2-50,3 %. I triage har 10,8 % av de med uegnet cytologi positiv HPV-test, 28,8 % av de med ASC-US og 51,9 % av de med LSIL.

Tabell 8. Triage. Positiv HPV-test fordelt på aldersgrupper.

Alder	Cytologi			Total N (%)
	Uegnet N (%)	ASC-US N (%)	LSIL N (%)	
< 25	12 (20)	104 (46)	180 (54)	296 (48)
25 - 69	137 (11)	1241 (29)	1198 (52)	2576 (33)
70 +	0 (0)	9 (26)	1 (20)	10 (25)
Total N (%)	149 (11)	1354 (30)	1379 (52)	2882 (34)

Tabell 9. Triage, CIN 2+. Fordeling av HPV resultat

Alder	Negativ (%)	Positiv (%)	Uegnet (%)	Total (N)
15 - 19	8	92	0	13
20 - 24	9	91	0	43
25 - 29	4	94	1	230
30 - 34	7	92	1	212
35 - 39	9	90	1	165
40 - 44	14	85	1	125
45 - 49	18	80	1	71
50 - 54	17	80	2	41
55 - 59	24	76	0	25
60 - 64	17	83	0	12
65 - 69	10	90	0	10
70 +	0	100	0	4
Total	10	89	1	951

Av de som har CIN 2+ histologi og negativ HPV-test (n=87) utgjør HPV-Positiver 64 % av disse, mens HCII står for 29 %.

Preliminære resultater fra Ahus studien

I januar 2005 startet Ahus opp en 5-årig prospektiv studie for å evaluere nye, kommersielle HPV-tester i cervix screening i samarbeid med Kreftregisteret. Kvinneklippene i Helse Innlandet og Østfold deltar også i studien. Studien og opprettelse av Forskningsbiobank er godkjent i Regional komité for medisinsk forskningsetikk, Helseregion Øst 2.12.2004 (676-04239) og Sosial- og helsedirektoratet 18.2.2005 (05/163). Kvinnene gir skriftlig informert samtykke til deltagelse i studien. Det er gitt konsesjon fra Datatilsynet for behandling av helseopplysninger 07/00975-2/SVE. Studien finansieres av forskningsmidler fra Helse Øst og Ahus.

Det er tre protokoller i studien, og det er laget detaljert flytskjema for kontrollopplegg i samtlige protokoller:

1. Kontrollgruppe med kvinner > 30 år som har normal cytologi siste 2 år og som ikke tidligere er behandlet for cervixneoplasi.
2. Kvinner med indexcytologi uegnet, ASC-US og LSIL (ingen aldersgrense)
3. "Follow-up" etter konisering (HPV-test tas før konisering og sammen med cytologi hver 6. mnd etter konisering)

HPV-tester som evalueres:

1. DNA-tester:

Amplicor (Roche) L1 basert PCR 165 bp fragment som påviser 13 hrHPV-typer (16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68).

Linear Array (Roche) genotyping, L1 basert PCR 480 bp fragment som diskriminerer mellom 37 HPV-typer (12 hr, 6 sannsynlig hr 10 LR og 9 genotyper som ikke er klassifisert)

2. RNA-test:

PreTect Proofer (NorChip AS) påviser fullengde mRNA transkripter fra HPV 16, 18, 31, 33 og 45.

Per. februar 2007 er 4125 celleprøver fra 2834 kvinner analysert; 2246 kvinner er inkludert i studien (739 i protokoll 1, 875 i protokoll 2, 632 i protokoll 3). Preliminære resultater er presentert på nasjonale og internasjonale konferanser.

DNA- versus RNA-testing viser at det er samsvar mellom testene hos 71 %, 25 % har positiv Amplicor/negativ Proofer. Det foreligger inkonklusive resultat (pga negativ HPV og negativ DNA/RNA kontroll) hos 1 % med Amplicor og 2,8 % med Proofer. Amplicor er signifikant hyppigere positiv i samtlige protokoller (tabell 7).

Tabell 7. HrHPV prevalens med DNA versus RNA testing hos kvinner med og uten cervixneoplasi.

	Amplicor +	Proofer +
Kontrollgruppen (N=739)	9%	3%
Triage (N=764)	55%	18%
CIN 2+ (N=646)	96%	64%

I kontrollgruppen avtar HPV prevalensen med alder; i aldersgruppen 30-39 år er 16,6 % HPV positive (med Amplicor og/eller Proofer). I tabell 8 er forekomst av HPV og høygradig histologi (CIN 2+) vist ved de ulike cytologidiagnoser i triage.

Tabell 8. Triage hrHPV prevalens relatert til cytologi og histologi (CIN2+).

	Amplicor +	Proofer +	CIN 2+
Uegnet cytologi (N=46)	26 %	7 %	38 %
ASC-US (N=457)	49 %	18 %	36 %
LSIL (261)	69 %	21 %	37 %

Leverandøren av Amplicor har opplyst at på grunn av høy analytisk sensitivitet vurderes grenseverdien hevet.

Blant kvinner med histologisk verifisert CIN 2+ (N=646) er Amplicor positiv hos 96 %, Linear Array hos 83 % og Proofer hos 64 % (Abstract 24.th IPV Conference, Beijing 2007). Ved DNA testing påvises et bredt spekter av genotyper og 52 % har multipl infeksjon med to eller flere genotyper. HPV 16/18 påvises hos 57 % av kvinnene med histologisk verifisert CIN 2+. Bare Proofer korrelerer signifikant med histologisk grad. Tilsvarende funn er gjort med en nylig kommersialisert RNA basert HPV-test, noe som kan tyde på at E6/E7 mRNA er nyttig biomarkør for CIN3+ (34).

Preliminære data fra Ahus studien viser at 97 % av kvinner som koniseres for CIN 2+ får påvist hrHPV og virus elimineres hos 76 % etter konisering. HPV status etter konisering er uavhengig av reseksjonsrender. Genotyping er nødvendig for å estimere risiko for utvikling av CIN 3+ og for å påvise persisterende atypi eller residiv etter behandling.

Diskusjon

Det finnes en rekke ulike tester for påvisning av HPV brukt i forskning, men få er standardisert og kommersielt tilgjengelige, og dermed uegnet for screening og diagnostikk. Det foreligger ingen nasjonale eller internasjonale randomiserte, populasjonsbaserte studier som sammenlikner de prediktive verdiene av de ulike kommersielle HPV-testene i screening. Det er antatt at høy analytisk sensitivitet for påvisning av HPV vil gi noe nedsatt spesifisitet.

En mulig forklaring på dette kan være at forbigående infeksjoner har noe lavere virus mengde per celle (viral load) enn der det er utviklet CIN 2+.

Prediktiv verdi av én enkelt HPV undersøkelse enten den er RNA- eller DNA- basert, er høyst tvilsom ved ASC-US. I en nylig publisert forlenger av ALTS studien, ble det vist at 91 % av de prevalente HPV infeksjoner ved studiestart var eliminert etter to år (42). Sannsynligheten for at en infeksjon persisterte for ytterligere seks mnd økte med varigheten av infeksjonen. De gjenværende infeksjoner etter to år har et høyt potensial for persistens og progresjon til høygradig cervixneoplasi (CIN2+). Tallene for insidens og clearance er forøvrig svært like de norske tallene for HPV16/18 i Merck studien (personlig meddelelse Finn Egil Skjeldestad). Genotyping for å fastslå persisterende HPV infeksjon er antatt å være en nøkkelfaktor for økt prediktiv verdi av HPV-testing i screening.

Det er ikke avklart hvilken av dagens HPV-tester som er egnet for screening og diagnostikk. En offensiv markedsføring av HPV DNA og RNA-tester i Norge for noen år siden, førte langt på vei til overforbruk av tester eller såkalt ”villscreening” uten klinisk indikasjon. Sosial- og helsedirektoratet så det ikke som sin oppgave å igangsette studier for å komme frem til riktig bruk av HPV- tester. Etter anbefaling fra Rådgivningsgruppen ble det 1.7.2005, innført takst for HPV-test. Taksten ble knyttet opp til spesielle cytologiske diagnoser, for kvinner i aldersgruppen 25-69 år, og kan bare utløses når testen er anbefalt av patolog. Det ble ikke lagt føringer for hvilke HPV-tester som skulle brukes. Retningslinjene for HPV-testing ble beskrevet i Kvalitetsmanualen (43). Det ble overlatt til fagmiljøene å velge HPV-test, og det ble ikke opprettet noe nasjonalt referanselaboratorium. I Kvalitetsmanualen er det ikke definert hva som menes med ”standardisert og validert HPV-test”, NGF har presisert ”validert for screening”.

Med hensyn til tolkning av begrepet standardisering ble denne faggruppen enig om at tester som er CE merket for *in vitro* diagnostikk må kunne oppfattes som standardiserte. Mange av prosedyrene er basert på teknisk utstyr som er høygradig standardisert. Kravet om standardisering er oppfylt forutsatt at personalet er kompetent, utstyr er vedlikeholdt og prosedyrer blir fulgt. Kvalitetssikring av dette gjøres stor sett i klinisk virologi ved ”benchmarking” i form av nasjonale eller internasjonale ringtester. HPV screeningen er mangelfull på dette området. Faggruppen har diskutert tolkningen av begrepet validert og har skilt mellom teknisk og klinisk validering. Teknisk validering går på vurdering av om en test detekterer de relevante HPV-typer, med fornøden sensitivitet og spesifisitet. Alle tester som er CE merket for *in vitro* diagnostikk må dokumentere graden av teknisk validering, men det settes ingen krav til yteevne og omfang av klinisk validering. I den kliniske validering blir det i tillegg til testen evne til å predikere CIN2+, viktig med en teststrategi som avslører persisterende infeksjon med onkogen HPV-type.

Data fra Kreftregisteret viser at det er i alt 13 laboratorier som gjør HPV-testing, 66 % av testene utføres av tre laboratorier (Ahus inkludert). Det er ikke gjort noe ringtesting (dvs. vurdering av interlab. reproducerbarhet). Fem forskjellige HPV-tester med ulik analytisk sensitivitet for HPV og ulik klinisk sensitivitet mht CIN2 og CIN3 er i bruk. Faggruppen mener at det er uheldig at det er så mange aktører og tester som brukes. Det er stor spredning i antall analyser, noe som svekker den vitenskapelige nytteverdien av data innhentet fra HPV registeret. Data fra 21 måneder er evaluert, og det foreligger histologisk oppfølging i bare 53 % av tilfellene som er i triage, (dvs. de med uegnet, ASC-US eller LSIL cytologi i aldersgruppen 25-69 år) og som har fått påvist HPV. Av disse har 57 % fått påvist CIN 2+. Grunnlagsmaterialet er derfor for lite og oppfølgingstiden er for kort til å beregne de prediktive verdier av de fem HPV-testene som er i bruk. Faggruppens konklusjon mht til

hvorvidt testene er klinisk validerte er derfor basert på publisert dokumentasjon for prediktiv verdi av histologisk verifisert CIN2+.

Lavgradig eller usikker cytologi kan representere celleforandringer som ikke er relatert til HPV infeksjon, men de kan også representere prøver med HPV relatert CIN2+. Hensikten med bruk av HPV-testing i triage er å unngå unødvendig biopsitaking og behandling uten tap av sensitivitet for påvisning av CIN2+. Siden alle med CIN2+ anbefales behandlet i Norge i dag, mener faggruppen at en validert test skal ha høy dokumenterbar prediktiv verdi for både CIN2 og CIN3. Siden den epidemiologiske betydningen av ulike hrHPV-typer er lite kartlagt i Norge, ble faggruppen enig om at en egnet test bør påvise de 12 HPV genotypene som i dag er klassifisert som onkogene (se tabell 1). Selv om tester som påviser E6/E7 RNA ekspresjon virker lovende mht prediktiv verdi for CIN3, har Proofer testen for lav prediktiv verdi for CIN2, sannsynligvis fordi den bare påviser fem hrHPV typer. Når det gjelder HPV-testing er det for tiden en rivende utvikling i teknologien og metoder som genotyper virus på en rask, enkel og sensitiv måte, disse testene er på vei inn i rutinediagnostikken.

Faggruppens konklusjon mht om retningslinjene følges bygger på data som laboratoriene selv har rapportert inn til Kreftregisteret. Over tid viser data fra Kreftregisteret at de nasjonale retningslinjene følges i større grad (26 % i første mot 59 % i siste kvartal). Det er de største laboratoriene som har de største avvikene og som dermed trekker gjennomsnittet ned. For hele perioden tas 47 % av testene uten at det foreligger uegnet/ASC-US eller LSIL cytologi siste 2-12 mnd. og 10 % utenfor aldersindikasjon. Faggruppen mener det er behov for betydelige endringer. Siden HPV laboratoriene som ikke selv utfører cytologidiagnostikken har liten mulighet for å vurdere indikasjonsstillingen, må cytologilaboratoriene stramme inn sine rutiner og kontrollere at de nasjonale retningslinjene følges. Det er cytolog og ikke rekvirent som skal avgjøre om HPV-testen skal gjennomføres. Laboratoriene har så langt ikke fått tilbakemelding på sin praksis. Det er derfor mulig at de største laboratoriene med de største avvikene vil kunne endre sin praksis hvis de får forelagt sine data og at alle cytologilaboratoriene blir oppfordret til å følge de nasjonale retningslinjene for HPV-testing. Det er uansett ikke realistisk å oppnå 100 % oppslutning om disse. Selv om takstene fjernes, blir ikke HPV-testingen borte. Tvert imot er flere i faggruppen bekymret for at dette vil kunne føre til ytterligere villscreening og økt aktivitet/nye tilbud fra private laboratorier. Det er for mange laboratorier som har etablert HPV-testing. Det er behov for en sentralisering av HPV diagnostikken, og det er en rekke forhold som må belyses i vitenskapelige studier. Dette ligger utenfor denne faggruppens mandat, og blir ikke nærmere omtalt i rapporten. HPV-diagnostikken bør gjøres ved universitetsklinikker med tilstrekkelig kompetanse innen HPV-diagnostikk, molekylærbiologi, patologi, virologi og gynekologisk onkologi. Det er også nødvendig at disse har tilstrekkelig stort prøvevolum og pasientgrunnlag. Ringtesting for å evaluere reproduserbarheten av HPV-testingen bør gjennomføres. Faggruppen har fått lite informasjon om vedtaket som nylig ble gjort i Helse- og omsorgsdepartementet vedrørende referanselaboratorium for HPV-testing. Observatør fra Sosial- og helsedirektoratet opplyste på siste møte i faggruppen at Folkehelseinstituttet og Avdeling for Mikrobiologi på Ahus er tildelt denne funksjonen. Det ble i gruppen stilt spørsmål om hvorfor helt sentrale faggrupper som patologer og gynekologer ikke har vært involvert i denne prosessen.

Følgende slutter seg til nedstående anbefalinger:

Bjørn Hagmar, Bjørn Hagen, Ole-Erik Iversen og Are Dalen (dobbelstemme som formann)

Anne Eskild dissenterer ut fra det prinsipale syn at HPV-testing i triage bør stoppes og at hvis det fortsetter, bør visse krav oppfylles. (Se protokolltilførsel side 32-33)

Agnes Kathrine Lie, Kirsti Vainio og Vigdis Lauvrak dissenterer vesentlig ut fra innvendinger mot punkt 1 i Anbefalinger (Se protokolltilførsel side 33-34).

Anbefalinger

1. De fem HPV-testene som er i bruk i Norge i dag er standardiserte, teknisk validerte og CE-merket etter IVD-direktiv. Fire av testene tilfredsstillende krav om påvisning av alle de 13 aktuelle onkogene typene, PreTect HPV-Proofer påviser fem genotyper. Det er kun en test- Hybrid Capture II (HCII)- som er akseptabelt klinisk validert og FDA godkjent. Prinsipielt kvalifiserer det testen til å være grunnlaget for utredningsalgoritmet og andre tester må betraktes som supplerende. HCII gir ikke svar på genotype og er derfor ikke egnet til å dokumentere persisterende infeksjon. Genotyping som supplement er derfor aktuelt. Pga lavere klinisk sensitivitet bør negativ Ventana og Norchip test snarest suppleres med PCR eller HCII, så lenge alle kvinner med CIN 2+ skal behandles.

Flere HPV-tester basert på ny og vesentlig forbedret teknologi er nylig blitt eller står i ferd med å kommersialiseres. HCII vil i følge produsenten fases ut. Det blir en viktig oppgave for en ny arbeidsgruppe å evaluere de nye tester.

2. Data fra HPV registeret viser at 47 % av HPV-testene tas uten at det foreligger uegnet, ASC-US eller LSIL cytologi, og 10 % tas utenfor aldersindikasjon. Over tid viser det seg imidlertid at de nasjonale retningslinjene følges i større grad (26 % i første kvartal mot 59 % i siste kvartal). I løpet av prøveperioden har man derfor til en viss grad oppnådd å få kontroll over villscreeningen. Full oppslutning om de nasjonale retningslinjene er neppe oppnåelig. Det er de største laboratorier med flest antall HPV analyser som har de største avvikene, og som dermed trekker gjennomsnittet ned. Cytologilaboratoriene bør få forelagt sine data snarest, og laboratorier med de største avvikene må endre sin praksis i henhold til retningslinjene for å få refusjon. Det er cytologilaboratoriet og ikke rekvirent som skal avgjøre om HPV-test skal utføres. Før celleprøven sendes videre for HPV-testing må indikasjonsstillingen vurderes.
3. Prøveperioden bør fullføres som planlagt for å få lengre observasjonstid og større datagrunnlag til å beregne de prediktive verdiene av HPV-testing som triage i Norge. Det forutsettes at Kreftregisteret gir laboratoriene snarlig tilbakemelding, og at pkt. 1 og 2 over blir ivaretatt snarest. HPV-diagnostikken bør sentraliseres til universitetsklinikker med tilstrekkelig kompetanse innen HPV-diagnostikk, molekylærbiologi, patologi, virologi og gynekologisk onkologi. Det er også viktig at disse har tilstrekkelig prøvevolum og pasientgrunnlag. Ringtesting bør gjennomføres for å evaluere interlaboratorie reproduserbarhet.
4. Dersom HPV-diagnostikken sentraliseres er det viktig å ha analyserutiner som gir optimal samordning mellom HPV-svar og cytologi.
5. En ny arbeidsgruppe bør etableres når prøveperioden er over for å evaluere HPV-test data, cervixcytologi- og histologi dataene som er samlet inn på Kreftregisteret. De økonomiske aspekter ved HPV-testing som sekundærskanning bør vurderes.

Likeledes bør HPV-testing som primærskanning vurderes i lys av de nylig publiserte data fra de randomiserte studiene i Canada og Sverige (44,45).

6. HPV infeksjoner er vanlige og hos de fleste kortvarige i ten- tidlig tjuårs alder. Påvist hrHPV i denne aldersgruppe har lav prediktiv verdi for senere utvikling av malignitet. Teststrategien bør være rettet mot å avdekke persisterende infeksjon som rammer et mindretall. De nylig publiserte data fra den randomiserte studien i Sverige (45) viser at den høyeste prediktive verdi for CIN2+ ved HPV-screening sees i aldersgruppen fra midten av 30 årene og oppover. Strategi for screening i eldre aldersgrupper bør være et tema i en fremtidig arbeidsgruppe.

Takk til Tormod Eriksen, Kreftregisteret for kobling av data.

Referanser

1. Nygard JF, Sauer T, Skjeldestad FE, Skare GB, Thoresen SO. CIN 2/3 and cervical cancer after an ASCUS pap smear. A 7-year, prospective study of the Norwegian population-based, coordinated screening program. *Acta Cytol.* 2003;47:991-1000.
2. Nygard JF, Sauer T, Nygard M, Skare GB, Thoresen SO. CIN 2/3 and cervical cancer in an organised screening programme after an unsatisfactory or a normal Pap smear: a seven-year prospective study of the Norwegian population-based screening programme. *J.Med.Screen.* 2004;11:70-6.
3. Scott DR, Hagmar B, Maddox P, Hjerpe A, Dillner J, Cuzick J et al. Use of human papillomavirus DNA testing to compare equivocal cervical cytologic interpretations in the United States, Scandinavia, and the United Kingdom. *Cancer* 2002;96:14-20.
4. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr* 2003;3-13.
5. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology* 2002;55:244-65.
6. zur-Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:342-50.
7. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:11-22.
8. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur HH. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
9. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24S3:S1-S10.
10. Lie AK, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R et al. DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol.Oncol.* 2005;97:908-15.
11. Poljak M, Marin IJ, Seme K, Vince A. Hybrid Capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J.Clin.Virol.* 2002;25 Suppl 3:S89-S97.
12. Terry G, Ho L, Londesborough P, Cuzick J, Mielzynska-Lohnas I, Lorincz A. Detection of high-risk HPV types by the hybrid capture 2 test. *J.Med.Virol.* 2001;65:155-62.
13. Seme K, Fujs K, Kocjan BJ, Poljak M. Resolving repeatedly borderline results of Hybrid Capture 2 HPV DNA Test using polymerase chain reaction and genotyping. *J.Virol.Methods* 2006;134:252-6.
14. HPV DNA test for livmorhalskreft. 2007. Kunnskapscenteret. Ref Type: Report

15. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 2003;362:1871-6.
16. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *J.Natl.Cancer Inst.* 2002;94:102-7.
17. Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol.Oncol.* 2007;104:232-46.
18. Andersson S, Hansson B, Norman I, Gaberi V, Mints M, Hjerpe A et al. Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int.J.Oncol.* 2006;29:705-11.
19. Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence--implications for cervical disease progression and monitoring. *J.Med.Virol.* 2004;73:65-70.
20. Cuschieri KS, Beattie G, Hassan S, Robertson K, Cubie H. Assessment of human papillomavirus mRNA detection over time in cervical specimens collected in liquid based cytology medium. *J.Virol.Methods* 2005;124:211-5.
21. Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedal H, Karlsen F, Hagmar B. Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *Br.J.Cancer* 2004;90:1407-13.
22. Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsen F, Kristensen GB et al. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J.Clin.Microbiol.* 2006;44:1310-7.
23. Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygard JF, Hagmar B. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2005;14:367-72.
24. Molden T, Nygard JF, Kraus I, Karlsen F, Nygard M, Skare GB et al. Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: A 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int.J Cancer* 2005;114:973-6.
25. Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Hagmar B. Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. *Gynecol.Oncol.* 2006;100:95-100.
26. Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrom T, Karlsen F. PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J.Virol.Methods* 2007;142:204-12.

27. Carozzi F, Bisanzi S, Sani C, Zappa M, Cecchini S, Ciatto S et al. Agreement between the AMPLICOR Human Papillomavirus Test and the Hybrid Capture 2 Assay in Detection of High-Risk Human Papillomavirus and Diagnosis of Biopsy-Confirmed High-Grade Cervical Disease. *J.Clin.Microbiol.* 2007;45:364-9.
28. Halfon P, Trepo E, Antoniotti G, Bernot C, Cart-Lamy P, Khiri H et al. Prospective Evaluation of the Hybrid Capture 2 and AMPLICOR Human Papillomavirus (HPV) Tests for Detection of 13 High-Risk HPV Genotypes in Atypical Squamous Cells of Uncertain Significance. *J.Clin.Microbiol.* 2007;45:313-6.
29. Sandri MT, Lentati P, Benini E, Dell'Orto P, Zorzino L, Carozzi FM et al. Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J.Clin.Microbiol.* 2006;44:2141-6.
30. Wahlstrom C, Iftner T, Dillner J, Dillner L. Population-based study of screening test performance indices of three human papillomavirus DNA tests. *J.Med.Virol.* 2007;79:1169-75.
31. Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, Biscotti CV, Layfield LJ. Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn.Cytopathol.* 2003;29:149-55.
32. Qureshi MN, Bolick D, Ringer PJ, Spagler FL, Zimmerman G. HPV testing in liquid cytology specimens: comparison of analytic sensitivity and specificity for in situ hybridization and chemiluminescent nucleic acid testing. *Acta Cytol.* 2005;49:120-6.
33. Layfield LJ, Qureshi MN. HPV DNA testing in the triage of atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS): cost comparison of two methods. *Diagn.Cytopathol.* 2005;33:138-43.
34. Castle PE, Dockter J, Giachetti C, Garcia FA, McCormick MK, Mitchell AL et al. A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin.Cancer Res.* 2007;13:2599-605.
35. Klaassen CH, Prinsen CF, de Valk HA, Horrevorts AM, Jeunink MA, Thunnissen FB. DNA microarray format for detection and subtyping of human papillomavirus. *J.Clin.Microbiol.* 2004;42:2152-60.
36. Park TC, Kim CJ, Koh YM, Lee KH, Yoon JH, Kim JH et al. Human papillomavirus genotyping by the DNA chip in the cervical neoplasia. *DNA Cell Biol.* 2004;23:119-25.
37. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J.Clin.Microbiol.* 2006;44:504-12.
38. Nygard JF, Nygard M, Skare GB, Thoresen SO. Screening histories of women with CIN 2/3 compared with women diagnosed with invasive cervical cancer: a retrospective analysis of the Norwegian Coordinated Cervical Cancer Screening Program. *Cancer Causes Control* 2005;16:463-74.

39. Cuzick J, Mayrand MH, Ronco G, Snijders P, Wardle J. Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S90-S97.
40. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S78-S89.
41. Davies P, Arbyn M, Dillner J, Kitchener HC, Meijer CJ, Ronco G et al. A report on the current status of European research on the use of human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *International Journal of Cancer* 2006;118:791-6.
42. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J.Infect.Dis.* 2007;195:1582-9.
43. Quality assurance manual Cervical Cancer Screening Programme. 2005. Cancer Registry of Norway.
44. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1579-88
45. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1589-97

Protokolltilførsler

Reservasjon fra flertallet i utvalget sine anbefalinger fra Anne Eskild

Mitt standpunkt er at prøveprosjektet med HPV-testing bør stoppes fordi vi ikke har nok kunnskap om konsekvensene av slik testing i et screeningprogram. Det er derfor, etter min mening, ikke forsvarlig å fortsette.

Vi vet ikke om HPV-testing, i tillegg til cervixcytologi, i større grad forebygger cervixcancer enn cytologi alene. Vi ingen garanti for at vi skaper mer skade enn gagn og i tillegg bruker unødvendige ressurser.

Vi har ingen systematisk kunnskap om hvordan enkeltpersoner reagerer på å få en positiv HPV-test.

Hvis HPV-testingen likevel skal fortsette ut prøveperioden må:

I) Kvinnene som deltar i cervixscreeningprogrammet informeres om at de også kan bli HPV-testet som ledd i et prøveprosjekt, begrunnelsen for slik testing og konsekvensene av en positiv HPV-test.

II) Det må sannsynliggjøres at man, når prøveperioden er slutt, har mer informasjon om nytteverdien av slik testing enn det vi har i dag og at data fra prøveperioden vil gi vesentlig tilleggsinformasjon om nytteverdien. Det må også sannsynliggjøres at verdien av den informasjonen som prøveprosjektet kan gi, oppveier kostnadene og eventuelle andre bivirkninger ved prøveprosjektet. Vi trenger systematisk informasjon om eventuelle skadevirkninger.

De parametrene som skal inngå i en samfunnsøkonomisk analyse av nytten av HPV-testingen må identifiseres nå, slik at den mulige verdien av videreføring av HPV-prøveprosjektet synliggjøres. Prøveprosjektet må være utformet og organisert slik at den etterspurte informasjonen er tilgjengelig ved prøveperiodens slutt.

Ønsker man å kunne bruke data fra prøveperioden til å finne tilnærmede mål for sensitivitet og spesifisitet av HPV-testing med hensyn på CIN+ i triage versus cytologi alene, er det lite gunstig å forsøke å "innskjerpe" test-rutinene som antydnet i anfallingene punkt 1,2 og 3. Da vil man endre "rutiner" for datainnsamlingen i prøveperioden. Det vil være vanskelig å kontrollere for slik endring i datainnsamlingen i dataanalyser. I tillegg er det vanskelig å si noe om sensitivitet og spesifisitet av HPV-testing, hvis ikke også tester kvinner uten celleforandringer på livmorhalsen blir testet.

Vedr. pkt 5. i anbefalingen. Etter min mening er det nytteverdien versus ulempene av HPV-testing med hensyn på å forebygge cervix-cancer som bør evalueres. HPV-testing som et ledd i forebygging av cervixcancer bør også vurderes opp mot andre forebyggende strategier.

Pkt. 6 i anbefalingen kan jeg ikke uttale meg om, siden jeg ikke forstår det som står der eller begrunnelsen.

Hvis man ønsker å studere persistens av HPV-infeksjon, er kanskje mRNA tester (E6/E7 ekspresjon) er bedre egnet enn DNA-tester. Anbefalingen i punkt 6 er derfor for meg vanskelig å forstå i forhold til anbefalingen i punkt 1.

Referanser

Holland WW, Stewart S, Masseria C. Policy brief. Screening in Europe. Brussel: European Observatory on Health Systems and Politics 2006. www.euro.who.int/document/E88698.pdf

Aas T, Markestad T. Informasjon før screening. Tidsskr Nor Lægeforen 2007;127:207

Finansdepartementet. Veileder i samfunnsøkonomisk anayse.

Moderniseringsdepartementet. Utredningsinstrukser med veileder i utredningsarbeid.

Reservasjon fra flertallets anbefalinger i punkt 1 og 3 fra Vigdis Luvrak, Kirsti Vainio og A.Kathrine Lie.

Vi er ikke enige i disse punktene med flertallet i utvalget (AD, BH, OEI og BH). Vårt forslag er:

1. De fem HPV-testene som er i bruk i Norge idag er standardiserte og teknisk validerte, men i ulik grad klinisk validert. Alle testene er CE-merket etter IVD direktiv. Siden dette gjelder for Europa, er det ikke grunnlag for å fraråde noen av disse HPV-testene brukt som triage i prøveperioden.

Hensikten med prøveperioden er å få bedre kunnskap om HPV-testing i triage øker sensitiviteten og spesifisiteten for påvisning av CIN2+. Det bør ikke gjøres endringer i teststrategien under prøveperioden, da en slik endring kan forringe datagrunnlaget for å beregne de prediktive verdiene av de forskjellige HPV-testene som brukes i dag.

Demed må også punkt 3 korrigeres:

3. Prøveperioden bør fullføres som planlagt for å få lengre observasjonstid og større datagrunnlag til å beregne de prediktive verdiene av HPV-testing som triage i Norge. Det forutsettes at Kreftregisteret gir laboratoriene snarlig tilbakemelding, og pkt. 2 over blir ivaretatt snarest. HPV diagnostikken bør sentraliseres til universitetsklinikker med tilstrekkelig kompetanse innen HPV diagnostikk, molekylærbiologi, patologi, virologi og gynekologisk onkologi. Det er også viktig at disse har tilstrekkelig prøvevolum og pasientgrunnlag. Ringtesting bør gjennomføres for å evaluere interlaboratorie reproduserbarhet.

Uenigheten går på:

- Vi mener at også Amplicor og PreTect HPV-Proofer til en viss grad er klinisk validert. Gruppen har ikke definert hva som er akseptabel klinisk validering og dette inngår heller ikke i mandatet. Det er histologi som er gullstandard for klinisk validering, ikke HCII.
- Selv om HCII er FDA godkjent, er dette en HPV-test med flere svakheter som er diskutert i rapporten. Testen mangler intern kontroll på DNA kvalitet og høyrisiko kit'et kryssreagerer med lavrisiko HPV-typer som ikke inngår i kitet, slik at falske negative og falske positive prøveresultater forekommer. Vi synes derfor ikke denne kan brukes som gullstandard for klinisk validering.

- Så lenge det i Norge kun pågår en prøveperiode med diagnostisk testing (ved uegnet, ASCUS eller LSIL cytologi), kan vi ikke pålegge laboratoriene å bruke HCII siden Norge og resten av Europa bruker CE-merkete tester i *in vitro* diagnostikk (IVD). Laboratoriene har dessuten fulgt anbefalingene i Kvalitetsmanualen som ikke definerer betydningen av ”validert” HPV-test.

Vi synes ikke det på det nåværende tidspunkt er grunnlag for å gi spesifikke anbefalinger på bruk av HPV-tester i Norge før hele prøveperioden er grundigere evaluert og data fra nyere studier er vurdert.

Oslo 07.01.2008

Vigdis Laurak
(sign.)

Kirsti Vainio
(sign.)

A. Kathrine Lie
(sign.)

Protokolltilførsel fra Bjørn Hagen og Ole Erik Iversen

"Som klinikerne i utvalget, og med referanse til Veileder i Gynekologisk Onkologi 2002 som i addendum anbefalte HPV-testing i triage fra mars 2005 vil vi presisere at det var en uttrykkelig og klinisk nødvendig forutsetning at man benyttet klinisk validert test. Andre tester måtte brukes parallelt da ble ansett som utprøvende. Fordi testresultatet brukes til daglig oppfølging i Masseundersøkelsen er denne forutsetningen nødvendig for klinisk og etisk forsvarlig praksis i lys av vi nå har en prøveperiode uten forskningprotokoll, etisk godkjenning og informert samtykke erklæring fra kvinnene" .

Bjørn Hagen (sign) Ole-Erik Iversen