

# Toelichting op het gebruik van interne controle bij primaire hrHPV-screening

Opgesteld door Esther Brouwer (CvB) in nauwe afstemming met Mariet Feltkamp (namens de NVMM), Rob Schuurman (lid werkgroep Kwaliteit) en Mariël Brinkhuis (lid werkgroep Kwaliteit)

## **Inleiding**

In de voorbereiding van deze uitvoeringstoets is de toepassing van interne controles bij primaire hrHPV-analyse besproken. Het doel van interne controles (IC) bij het hrHPV-test is om enerzijds te controleren of het afgenomen materiaal voldoende (relevant) celmateriaal bevat en anderzijds om na te gaan of de hrHPV-test op de juiste wijze is uitgevoerd (amplificatiereactie). Hiermee zou het afgeven van fout-negatieve testuitslagen kunnen worden voorkomen.

Deze notitie bevat een analyse van de mogelijke toepassingen van interne controles bij de hrHPV-test. Daarbij is gekeken naar de beschikbaarheid van interne controles, de functionaliteit en toepasbaarheid van deze controles, de mogelijke risico's en de mogelijke (meer)kosten voor het bevolkingsonderzoek. Tevens is voorzien in een conclusie hoe in de voorbereidingsfase van het voorgestelde bevolkingsonderzoek het gebruik van interne controles in de primaire hrHPV-screening verder zal worden uitgewerkt. Zowel bij analyse als conclusie is een onderscheid gemaakt naar de interne controle op celmateriaal en de interne controle op juiste uitvoering van de hrHPV-test.

## **Interne controle op celmateriaal**

De interne controle op de aanwezigheid van (voldoende) celmateriaal wordt gebruikt om te controleren of het afnamemateriaal voldoende humaan DNA bevat. Doel daarvan is om een uitspraak te kunnen doen over een mogelijke fout-negatieve uitslag voor hrHPV door onvoldoende of onjuiste afname van het materiaal. Een negatief interne controle resultaat zou aldus vergeleken kunnen worden met het huidige onbeoordeelbare uitstrijkje bij de cytologische screening.

### Beschikbaarheid van interne controle op celmateriaal

Ten behoeve van een inschatting van de financiële consequenties van de invoering van het voorgestelde bevolkingsonderzoek is onder een aantal leveranciers van hrHPV-testen een request for information (RFI) uitgezet. Daarin is tevens navraag gedaan naar enkele specifieke testeigenschappen van de aangeboden hrHPV-test. Uit de verkregen informatie blijkt dat meerdere hrHPV-testen beschikken over een interne  $\beta$ -globine controle op aanwezigheid van humane cellen (humaan DNA). Bij de hrHPV-testen zonder deze interne controle, geven de meeste leveranciers aan dat een controle van celmateriaal als onderdeel van het proces mogelijk is.

### Functionaliteit en toepasbaarheid

Bij de interne controle op celmateriaal zijn de volgende drie aspecten van belang:

- de aanwezigheid van afgenomen materiaal (humaan DNA);
- de aanwezigheid van indicatorcellen;
- de relatie tussen humaan DNA en viraal DNA.

### *De aanwezigheid van afgenomen materiaal*

Bij het huidige bevolkingsonderzoek wordt de kwaliteit van het afgenomen materiaal bij de cytologische beoordeling bepaald. Bij het voorgestelde bevolkingsonderzoek met hrHPV-screening is er zonder gebruik van een IC geen controle op de aanwezigheid van voldoende celmateriaal. Met de introductie van de zelfafnameset (ZAS) bestaat de kans dat het aantal monsters zonder celmateriaal toeneemt. De beschikbare interne controles ( $\beta$ -globine) toetsen op de aanwezigheid van humane cellen (humaan DNA). Door het signaleren van een negatief IC-testresultaat bestaat de mogelijkheid om vrouwen opnieuw uit te nodigen en alsnog een adequaat monster te verkrijgen.

### *De aanwezigheid van indicatorcellen*

Bij de ontwikkeling van baarmoederhalskanker wordt het HPV DNA vaak opgenomen in het DNA van de baarmoederhals epitheelcellen, waardoor daarin genetische veranderingen optreden. Deze genetische veranderingen worden van belang geacht in het ontstaan van baarmoederhalskanker (referentie: proefschrift Suzanne Hazelbag, onderzoek naar immunologische factoren van het cervix carcinoom, LUMC, 2006). De beschikbare interne controles kunnen geen onderscheid maken tussen soorten cellen, zoals tussen cervix epitheel (indicator) cellen en andere (vaginale) cellen. De grootste oorzaak van fout-negatieve uitslagen is een slechte of foutieve afname van het monster en daarmee het ontbreken van cellen (de feitelijke onbeoordeelbaarheid voor de hrHPV-test). Vanwege het ontbreken van een specifieke marker voor cervixepitheel kan er met behulp van een interne controle niet worden vastgesteld of er indicatorcellen in het afgenomen materiaal zitten.

### *De relatie tussen humaan DNA en viraal DNA*

De beschikbare interne controles toetsen de aanwezigheid van humaan DNA. De relatie van het gastheer DNA (humaan) met viraal DNA (HPV) is echter onbekend. De hoeveelheid aanwezig humaan DNA in het afnamemonster hoeft geen relatie te hebben met de hoeveelheid aanwezig viraal DNA. Met andere woorden, een monster met een hoge concentratie gastheer DNA ("goede IC") kan heel weinig viraal DNA bevatten en vice versa (er kan 1 viraal DNA copie aanwezig zijn per 10.000 cellen of vice versa). Een negatief interne controle-resultaat kan derhalve een positieve hrHPV-bevinding niet verwerpen.

Volgend op het bovenstaande speelt bij het vaststellen van een gevalideerde afkapwaarde van de interne controle de (ontbrekende) correlatie met aanwezigheid van hrHPV en indicatorcellen geen rol. De afkapwaarde kan derhalve laag zijn en alleen gebaseerd op het aantonen van gastheercellen als maat voor goede afname.

### Risico's

In de werkgroep kwaliteit is aangegeven dat een IC noodzakelijk is om per monster de kwaliteit van afname te bepalen. Met name bij de zelfafnameset bestaat de kans dat het aantal monsters zonder celmateriaal groter is dan bij een afname door de huisartsenvoorziening. Uit de PROTECT-studies naar hrHPV in zelfafname monsters blijkt het percentage onbeoordeelbare monsters klein te zijn namelijk 0,2% (Gok et al. BMJ. 2010 Mar 11;340:c1040) (Gok et al., Int J Cancer 130, 1128-1135, 2012).

Daarbij dient gerealiseerd te worden dat de harde longitudinale data van alle studies die ten grondslag liggen aan het advies voor primaire HPV screening door de Gezondheidsraad zijn verkregen met testen die geen interne controle hebben (Rijkaart et al., Lancet 2012; Naucler et al., NEJM 2007; Ronco et al. JNCI 2008 en Lancet Oncol, 2010; Arbyn et al Vaccine 2012). Echter in deze studies werd steeds cytologie uitgevoerd op alle monsters; hetgeen in het voorgestelde bevolkingsonderzoek niet het geval zal zijn.

### Kosten

Bij de hrHPV-testen die standaard een interne  $\beta$ -globine controle meeleveren, is dit in de prijs van de testkit meegenomen. Bij de hrHPV-testen zonder standaard interne controle kan een real-time PCR controle voor celmateriaal tegen (meer)kosten worden bijgeleverd.

### **Interne controle op juiste uitvoering hrHPV-test**

Er kunnen tijdens de voorbereiding en beoordeling van het monster op de aanwezigheid van hrHPV onvolkomenheden optreden waardoor de test niet optimaal verloopt. Door tegelijkertijd met de hrHPV-test een parallelle controle-bepaling uit te voeren, kan worden gecontroleerd of de uitvoering van het detectieproces correct is verlopen.

### Functionaliteit en toepasbaarheid

Een groot deel van de beschikbare hrHPV-testen zijn zogenoemde polymerase chain reactions ofwel PCR's. De PCR is een methode om DNA in korte tijd vele malen achter elkaar te laten verdubbelen (amplificatie) waarna verdere analyse mogelijk is. Een interne controle die controleert

of deze amplificatie-reactie (het multipliceren van het DNA) adequaat verloopt, is een valide controle die breed wordt ingezet binnen de klinische moleculaire microbiologie. Er kan "materie" in het DNA van een klinisch monster aanwezig zijn, dat een dermate remmend effect kan hebben op de amplificatie-reactie dat daardoor een potentieel target als HPV minder effectief geamplificeerd kan worden. Hierdoor zou er een fout-negatief resultaat gegenereerd kunnen worden. Door tegelijkertijd met de hrHPV-test een parallelle controle-bepaling uit te voeren op een substantie (een cellulair gen) die in elk monster aanwezig is, kan worden gecontroleerd of de uitvoering van de hrHPV-test correct is verlopen. Het is mogelijk een parallelle controle-bepaling uit te voeren door gebruik te maken van zogenaamde 'spikes'. Daarbij wordt DNA, meestal van niet humane oorsprong, aan het monster toegevoegd wat vervolgens in de test gedetecteerd moet worden. Detectiefalen van de spike geeft aan dat de test niet goed heeft kunnen verlopen. Binnen de microbiologie wordt er veelal gebruik gemaakt van het zeehondenvirus (PhHV) wat niet aan humane virussen gerelateerde sequenties bevat.

#### Kosten/baten

Bij gebruik van een 'spike' zullen aparte primer/probes aangeschaft moeten worden waardoor de kosten naar alle waarschijnlijkheid merkbaar gaan stijgen. Uit ervaringen met grote screeningsstudies blijkt dat remming van amplificatie in DNA van cerixuitstrijken of zelf afgenomen vaginale monsters beperkt is. Gezien de beperkte risico's dient vanuit het kosten-baten aspect de afweging gemaakt te worden of voor grote screenings als het bevolkingsonderzoek baarmoederhalskanker een interne controle op de amplificatie reactie noodzakelijk is, of dat kan worden volstaan met een IC ( $\beta$ -globine) die in combinatie, en dus niet separaat, zowel de aanwezigheid van voldoende cellen in het sample als een efficiënte amplificatie bepaalt.

#### **Conclusie**

##### Interne controle op celmateriaal

Zonder het gebruik van een IC is er geen controle mogelijk of er een monster (voldoende goed) is afgenomen. Daarom is het belangrijk het gebruik van een IC voor bovenstaand doel als kwaliteitseis op te nemen. De IC maakt dan onderdeel uit van het primaire proces. Omdat de hrHPV-testresultaten niet per se correleren met IC-bevindingen, geldt het uitgangspunt dat een positieve hrHPV-test leidend is boven een IC negatieve test. Dit betekent dat een onbeoordeelbare test uitsluitend wordt afgegeven als zowel de IC negatief als de hrHPV-test negatief zijn.

Bij het opstellen van het programma van eisen voor de aanbesteding van de hrHPV-test wordt nader uitgewerkt of de interne controle als knock out (kritische kwaliteitseis) opgenomen dient te worden. In de voorbereidingsfase zal nader worden onderzocht of de inzet van een interne controle in bredere zin zou kunnen worden toegepast, ter waarborging van de afname van het juiste celmateriaal (indicatorcellen) aangezien bij positief hrHPV-testresultaat cytologische triage dient te worden uitgevoerd bij voorkeur op hetzelfde afgenomen celmateriaal.

##### Interne controle op juiste uitvoering hrHPV-test

Bij het opstellen van het programma van eisen voor de aanbesteding van de hrHPV-test wordt nader uitgewerkt of de interne controle in het primaire proces tbv de juiste uitvoering van de test als kwaliteitseis opgenomen dient te worden. In ieder geval dient de controle op de juiste uitvoering van de test in de monitoring opgenomen te worden.