



HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

RAPPORT D'ÉVALUATION TECHNOLOGIQUE - ANNEXES

Conditions pré-analytiques de réalisation de la recherche du génome (ADN) des Papillomavirus Humains (HPV) oncogènes à partir de frottis cervico-utérins

Octobre 2013

Les annexes du rapport d'évaluation technologique sont téléchargeables sur
www.has-sante.fr

Haute Autorité de Santé

Service documentation – Information des publics
2, avenue du Stade de France – F 93218 Saint-Denis La Plaine Cedex
Tél. : +33 (0)1 5 5 93 70 00 – Fax : +33 (0)1 55 93 74 00

Sommaire

Annexe 1. Méthode générale d'élaboration d'un rapport d'évaluation d'une technologie de santé	4
Annexe 2. Recherche documentaire.....	6
Annexe 3. Concordance, index Kappa	10
Annexe 4. Tableau des principaux milieux de conservation et trousse de détections identifiés par le CNR des HPV	11
Annexe 5. Extrait du GBEA (Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médical)	12
Annexe 6. Tableaux d'analyse des études	18
Annexe 7. Questionnaire destiné aux experts	34
Annexe 8. Comptes rendus des auditions des experts	41
Annexe 9. Liste des tableaux.....	67
Fiche descriptive	68

Annexe 1. Méthode générale d'élaboration d'un rapport d'évaluation d'une technologie de santé

L'évaluation des technologies de santé est, selon l'*Institute of Medicine* (1985) « une démarche dont l'objet est d'examiner les conséquences à court et à long terme, de l'usage d'une technologie particulière sur les individus et sur la société dans son ensemble. Elle prend en compte la sécurité, l'efficacité expérimentale et pragmatique d'une technologie, ainsi que son impact économique (coût, rapport coûts/résultats et implications budgétaires) ; elle analyse également ses implications sociales et éthiques et met à jour les points à approfondir en terme de direction de recherche ». L'objectif est d'éclairer la décision publique par un avis argumenté prenant en compte les différentes dimensions du sujet.

Analyse critique des données identifiées de la littérature scientifique

Une recherche documentaire méthodique est effectuée d'abord par interrogation systématique des bases de données bibliographiques médicales et scientifiques sur une période adaptée à chaque thème. En fonction du thème traité, des bases de données spécifiques peuvent être consultées. Une étape commune à toutes les études consiste à rechercher systématiquement les recommandations pour la pratique clinique, conférences de consensus, revues systématiques, méta-analyses et autres travaux d'évaluation déjà publiés au plan national et international. Tous les sites Internet utiles (agences gouvernementales, organisations professionnelles, etc.) sont consultés. Les documents non accessibles par les circuits conventionnels de diffusion de l'information (littérature grise) sont recherchés par tous les moyens disponibles. Par ailleurs, les textes législatifs et réglementaires pouvant avoir un rapport avec le thème sont consultés. Les recherches initiales sont mises à jour jusqu'au terme du projet. L'examen des références citées dans les articles analysés permet de sélectionner des articles non identifiés lors de l'interrogation des différentes sources d'information. Enfin, les membres des groupes de travail et de lecture peuvent transmettre des articles de leur propre fonds bibliographique. Le paragraphe « Recherche documentaire » présente le détail des sources consultées ainsi que la stratégie de recherche propres à ce rapport d'évaluation.

La position argumentée de professionnels de santé

Les organisations professionnelles sont consultées pour connaître les travaux réalisés sur le sujet et pour proposer une liste d'experts de la technique à évaluer, des autres options thérapeutiques ou de la pathologie étudiée. Le groupe de travail est composé d'une quinzaine de professionnels de différentes spécialités, de différents modes d'exercice (public et libéral, universitaire et non-universitaire) et de différentes localisations géographiques. Chaque membre du groupe de travail a rempli une déclaration publique d'intérêts qui a été examinée par la HAS. En cas d'intérêts déclarés, la HAS a estimé qu'ils étaient compatibles avec participation des personnes concernées, au groupe de travail, eu égard à leur expertise par rapport au sujet. La déclaration publique d'intérêts de chacun des membres est mise en ligne sur le site internet de la HAS ; le cas échéant, les intérêts déclarés pouvant avoir un lien avec le sujet évalué, sont présentés dans le rapport. Le groupe de travail se réunit en général une fois. Un rapport présentant la problématique, le champ, la méthode et l'analyse critique de la littérature est envoyé aux membres du groupe de travail avec un questionnaire pour recueillir leur position de manière formalisée et standardisée avant la réunion. Lors de la réunion, les membres du groupe de travail discutent sur la base de leur expertise et de l'analyse de la littérature des différents critères permettant d'estimer la validité de la technique (ratio efficacité/sécurité, indications, place dans la stratégie de prise en charge, conditions de réalisation, etc.) et aboutissent, le cas échéant, à un consensus.

La réunion est menée d'une manière structurée en s'appuyant sur une liste de questions. Le compte rendu de la réunion (discussion et position finale) est rédigé par la HAS et envoyé aux membres du groupe de travail pour validation.

Au vu de l'analyse critique de la littérature identifiée et de la position argumentée des professionnels de santé du groupe de travail, le Collège de la HAS, après examen et validation du dossier par la Commission nationale d'évaluation des dispositifs médicaux et des technologies de santé (CNEDiMTS) conclut quant à la validité de la technologie de santé étudiée en précisant selon les cas, ses indications, sa place dans la stratégie de prise en charge des patients, les conditions de sa bonne réalisation, les conséquences de son introduction dans le système de soins. La composition du Collège de la HAS et de la CNEDiMTS est présente sur le site Internet de la HAS.

Annexe 2. Recherche documentaire

1 - Bases de données bibliographiques

La stratégie d'interrogation des bases de données précise pour chaque question et/ou types d'étude les termes de recherche utilisés, les opérateurs booléens et la période de recherche.

Les termes de recherche utilisés sont soit des termes issus de thésaurus (descripteurs), soit des termes libres (du titre ou du résumé). Ils sont combinés avec les termes décrivant les types d'études.

La recherche a porté sur les publications en langue anglaise et française.

Les tableaux 1 et 2 présentent de façon synthétique les étapes successives de cette interrogation dans la base de données *Medline* et la base de données Pascal.

Le nombre total de références obtenues par interrogation des bases de données bibliographiques est **304**.

Tableau 1. Stratégie de recherche dans la base de données *Medline*.

Type d'étude / sujet	Termes utilisés	Période
Milieu de culture		
Tous types d'études		Pas de limite – 11/2011
Etape 1	(Papillomaviridae!/(isolation and purification OR genetics OR cytology OR analysis)/de OR Papillomavirus Infections/(diagnosis OR virology)/de OR Cervical Intraepithelial Neoplasia/virology/de OR Uterine Cervical Neoplasms/virology/de OR Head and Neck Neoplasms!/virology/de OR ((HPV OR papilloma*)/ti AND (isolation OR purification OR analys* OR detection* OR test* OR genotyp*)/ti)	
ET		
Etape 2	Culture Media!/de OR Culture Media/Substance OR Culture Media/Pharmacological Action OR (culture medi* OR transport medi* OR storage medi*)/ti	
SAUF	Cell Line, Transformed/de OR (immortaliz* OR cell line* OR transformed cell*)/ti	
Contrôle qualité		
Tous types d'études		Pas de limite – 11/2011
Etape 1		
ET		
Etape 3	Quality control!/de OR quality control*/ti	
Manipulation des échantillons		
Tous types d'études		Pas de limite – 11/2011
Etape 1		
ET		
Etape 4	Specimen Handling!/(methods OR standards)/de OR specimen handling/ti	
Frottis du col utérin		
Recommandations		Pas de limite –01/2013
Etape 5	Vaginal Smears/methods/de OR (cervical smear* OR vaginal smear* OR liquid-based cytology)/ti	
AND		
Etape 6	(Practice Guidelines as Topic OR Health Planning Guidelines)/de OR (Practice Guideline OR Guideline OR Consensus Development Conference OR Consensus Development Conference, NIH)/pt OR (recommendation* OR guideline*)/ti	
Facteurs de dégradation de l'ADN		
Tous types d'études		Pas de limite –04/2013
Etape 7	(DNA preservation OR preservation of DNA*)/ti,ab OR ((Fixatives OR Temperature! OR Formaldehyde! OR Hydrogen-Ion Concentration!/adverse effects OR Time Factors)/de AND Polymerase Chain Reaction/de AND 'Sensitivity and Specificity!'/de AND DNA, Viral/de) OR ((DNA!/isolation and purification OR DNA!/chemistry)/de	

Type d'étude / sujet	Période
<p>Termes utilisés</p> <p>AND (Fixatives OR Temperature! OR Formaldehyde! OR Hydrogen-Ion Concentration/adverse effects OR Time Factors)/de AND Polymerase Chain Reaction!/de) OR ((Methanol OR Ethanol!)/de AND Preservation, Biological!/de AND DNA!/de) OR (Histocytological Preparation Techniques!/de AND DNA!/isolation and purification/de AND DNA Damage!/de) OR ((DNA integrity OR DNA degradation)/ti AND (collection* OR storage OR specimen preparation)/ti) OR ((cervical smear* OR vaginal smear*)/ti AND (DNA integrity OR DNA OR DNA damage*)/ti) OR (DNA!/isolation and purification/de AND DNA Damage!/de) OR (Histocytological Preparation Techniques!/de AND DNA!/isolation and purification/de AND DNA Damage!/de) OR (Histocytological Preparation Techniques/de AND DNA!/chemistry/de AND DNA Damage!/de) OR (Specimen Handling!/de AND (DNA!/drug effects OR DNA!/radiation effects)/de)</p>	

de : descripteur ; ti : titre ; ab : résumé ; * troncature ; !: explosion, tous les termes spécifiques sont pris en compte

Tableau 2. Stratégie de recherche dans la base de données Pascal.

Type d'étude / sujet	Période
<p>Termes utilisés</p> <p>Frottis du col utérin et conservation ou transport de l'échantillon</p> <p>Etape 1 Frottis/de OR (frottis OR FCU)/ti ET</p> <p>Etape 2 Col utérus/de OR (col uter* OR cervical)/ti ET</p> <p>Etape 3 Conservation échantillon/de OR (conservation OR transport)/ti</p> <p>Frottis du col utérin et cytologie ou phase pré-analytique</p> <p>Etape 1 ET</p> <p>Etape 4 Cytologie/de OR (cytologie phase liquide)/ti OR pre-analytique/ti,ab</p> <p>Pratique professionnelle en anatomo-cytologie</p> <p>Etape 5 (Pratique Professionnelle OR Assurance Qualité) OR (bonnes pratiques OR assurance qualite)/ti,ab OR recommandation*/ti</p> <p>AND</p> <p>Etape 6 (Anatomopathologie OR Cytologie OR Examen ILaboratoire)/de OR (anatomo pathologie OR anatomopathologie)/ti,ab OR (cytologie phase liquide)/ti</p>	<p>Pas de limite – 01/2013</p> <p>Pas de limite – 01/2013</p> <p>Pas de limite – 01/2013</p>

de : descripteur ; ti : titre ; ab : résumé ; * troncature

2 – Sites consultés

Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques – AFAQAP

Association française des internes en anatomie et cytologie pathologiques – AFIAP

Bibliothèque médicale Lemanissier

Catalogue et index des sites médicaux francophones – CISMéF

Collège national des gynécologues obstétriciens français – CNGOF

Collège universitaire français des pathologistes – CUPF

Comité d'évaluation et de diffusion des innovations technologiques – CEDIT

Comité français d'accréditation – COFRAC

Division française de l'académie internationale de pathologie

Evaluation des technologies de santé pour l'aide à la décision (Fédération hospitalière de France) – ETSAD

Fédération nationale des collèges de gynécologie médicale

Institut Pasteur

Société française de colposcopie et pathologies cervico-vaginales

Société française de cytologie clinique – SFCC

Société française de microbiologie – SFM

Société française de pathologie – SFP

Académie Internationale de cytologie

Adelaide Health Technology Assessment – AHTA

Agency for Healthcare Research and Quality – AHRQ

Alberta Heritage Foundation for Medical Research

Alberta Medical Association

American College of Physicians

American Society for Colposcopy and Cervical Pathology

American Society for Cytotechnology

American Society of Cytopathology

Australian Safety and Efficacy Register of New Interventional Procedures – Surgical

Blue Cross Blue Shield Association - Technology Evaluation Center

BMJ Clinical Evidence

California Technology Assessment Forum

Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health – CADTH

Canadian Association of Pathologists

Canadian Task Force on Preventive Health Care

Centre fédéral d'expertise des soins de santé – KCE

Centre for Clinical Effectiveness

Centre for Reviews and Dissemination databases

Clinical and Laboratory Standards Institute

Clinical Practice Guidelines Portal

CMA Infobase

Cochrane Library

College of American Pathologists

European Federation of Cytology Societies – EFCS

European screening cervical Cancer Network

Euroscan

Expertise collective de l'INSERM

Guideline Advisory Committee

Guidelines and Protocols Advisory Committee – GPAC

Guidelines International Network – GIN

Health Services Technology Assessment Text – HSTAT

Horizon Sanning

Institut national d'excellence en santé et en services sociaux – INESS

Institute for Clinical Evaluative Sciences – ICES

Institute for Clinical Systems Improvement – ICSI

Institute for Health Economics Alberta

International Academy of Cytology – IAC

International Federation of Gynecology and Obstetrics – FIGO

Medical Services Advisory Committee

National Coordinating Centre for Health Technology Assessment – NCCHTA

National Guideline Clearinghouse – NGC

National Health and Medical Research Council – NHMRC

National Horizon Scanning Centre – NHSC

National Institute for Health and Clinical Excellence – NICE

New Zealand Guidelines Group – NZGG

New Zealand Health Technology Assessment

NHS Cervical Screening Programme

NHS Evidence

Ontario Health Technology Advisory Committee

Prodigy

Rideout Health

Scottish Intercollegiate Guidelines Network – SIGN

Singapore Ministry of Health

Société belge de cytologie Clinique

Société européenne de gynécologie

Tripdatabase

U.S. Preventive Services Task Force

Veterans affairs, Dep. Of Defense Clinical practice guidelines

Veterans Affairs Technology Assessment Program

3- Veille

Une veille a été effectuée dans la base de données *Medline* à partir des équations « Milieu de culture », « Contrôle Qualité » et « Manipulation des échantillons » du tableau 1, jusqu'à avril 2013.

Annexe 3. Concordance, index Kappa

Ce paragraphe est issu du site internet sur le coefficient Kappa : http://kappa.cher-alice.fr/kappa_intro.htm

► Définition du coefficient Kappa

L'accord observé entre des jugements qualitatifs ou non, résulte de la somme d'une composante «aléatoire» et d'une composante d'accord «véritable».

Le coefficient Kappa K propose de chiffrer l'intensité ou la qualité de l'accord réel entre des jugements qualitatifs appariés.

Il exprime une différence relative entre la proportion d'accord observée P_o et la proportion d'accord aléatoire P_e qui est la valeur espérée sous l'hypothèse nulle d'indépendance des jugements, divisée par la quantité disponible au-delà de l'accord aléatoire.

En définitive, K est un pourcentage de l'accord maximum corrigé de ce qu'il serait sous le simple effet du hasard.

La valeur vraie du coefficient Kappa dans la population est une variable aléatoire qui suit approximativement une loi de Gauss de moyenne K et de variance $Var(K)$. L'hypothèse nulle H_0 est $K = 0$ contre l'hypothèse alternative $H_1 : K > 0$.

Dans le cas d'une étude d'accord entre deux observateurs statistiquement indépendants ayant r modalités de jugement, avec $r \geq 2$, le coefficient Kappa s'écrit :

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

P_o : la proportion d'accord observée

P_e : la proportion d'accord aléatoire ou concordance attendue sous l'hypothèse d'indépendance des jugements.

Tableau 3. Tableau de Degré d'accord et valeur de Kappa.

Accord	Kappa
Excellent	$\geq 0,81$
Bon	0,80 - 0,61
Modéré	0,60 - 0,41
Médiocre	0,40 - 0,21
Mauvais	0,20 - 0,0
Très mauvais	$< 0,0$

Annexe 4. Tableau des principaux milieux de conservation et trousse de détections identifiés par le CNR des HPV

Le tableau ci-dessous présente les principaux milieux de transport validés dans les notices des trousse de détection et de génotypage des HPV, identifiés par le CNR des HPV (à la date du 18 juin 2013), et transmis à la HAS.

Milieux de transport validés dans les notices des trousse de détection et de génotypage des HPV à la date du 18 juin 2013

Trousses de détection	Milieu	Conditions de conservation après prélèvement	Référence de la notice
Amplicor® (Roche)	Hologic PreservCyt®	De 2 à 30 °C jusqu'à 26 semaines	Version 11 - 01/2013
	BD SurePath®	De 2 à 8 °C jusqu'à 2 semaines	
Aptima® (Hologic)	Hologic PreservCyt®	De 8 à 30 °C jusqu'à 5 semaines De 2 à 8 °C jusqu'à 15 semaines A -20°C jusqu'à 104 semaines	Version 503744 Rev.A du 08-2012
	BD SurePath®	De 2 à 25 °C jusqu'à 1 semaine puis 1 semaines de 2 à 25 °C après transfert dans un tube de transfert d'échantillons APTIMA	
	APTIMA CSCT Kit®	De 2 à 30 °C jusqu'à 9 semaines A -20°C jusqu'à 104 semaines	
Cervista® (Hologic)	Hologic PreservCyt®	De 20 à 30°C jusqu'à 24 semaines	Version 15-3053-901_103 de 2011
	BD SurePath®	De 20 à 30°C jusqu'à 6 semaines	
Cobas® 4800 (Roche)	Hologic PreservCyt®	De 2 à 30 °C jusqu'à 26 semaines	Version 5.0 du 10-2012
	BD SurePath®	De 15 à 30°C jusqu'à 2 semaines De 2 à 8 °C jusqu'à 26 semaines	
	Cobas® PCR Cell Collection Media®	De 2 à 30 °C jusqu'à 26 semaines	
Hybrid Capture test HC2 (Qiagen)	Hologic PreservCyt®	De 2 à 30 °C jusqu'à 13 semaines	Version 3 de 2008
	BD SurePath®	Non précisées	
	Qiagen STM®	De 15 à 30°C jusqu'à 2 semaines Puis : - De 2 à 8 °C jusqu'à 1 semaine - A -20°C jusqu'à 13 semaines	
	DNAPap™ Cervical Sampler™	Non précisées	
	HC Cervical Sampler™	Non précisées	
RT HR HPV (ABBOTT)	Hologic PreservCyt®	De 15 à 30°C jusqu'à 17 semaines De 2 à 8 °C jusqu'à 26 semaines A -10°C ou température inférieure jusqu'à 26 semaines	Version Mars 2010
	BD SurePath®	De 15 à 30°C jusqu'à 9 semaines De 2 à 8 °C jusqu'à 26 semaines A -10°C ou température inférieure jusqu'à 26 semaines	
	Abbott Cervi-Collect Specimen Collection Kit®	De 2 à 30°C jusqu'à 2 semaines A -20°C jusqu'à 13 semaines	

Trousses de génotypage	Milieu	Conditions de conservation après prélèvement	Référence de la notice
Clart® HPV2 (Genomica)	Hologic PreservCyt®	A 4°C jusqu'à utilisation (Durée non précisée)	Version 9 du 12-2010
INNO-LiPA® (Innogenetics)	BD SurePath®	Non précisées	Version 2 du 03-08-2012
Linear Array® (Roche)	Hologic PreservCyt®	De 2 à 30 °C jusqu'à 26 semaines	Version 10 du 09-2012
NucliSENS EasyQ® (Biomérieux)	Hologic PreservCyt®	De 15 à 30°C jusqu'à 6 semaines De 2 à 8 °C jusqu'à 6 semaines A -20°C jusqu'à 6 semaines	Version 1.1 du 02-2010
	BioMérieux Cymol®	De 15 à 30°C jusqu'à 3 semaines A -20°C jusqu'à 6 semaines	
PapilloCheck® (Greiner BioOne)	Hologic PreservCyt®	De 2 à 30 °C jusqu'à 13 semaines *	Version du 08-2011
	BD Surepath®	De 2 à 30°C jusqu'à 4 semaines *	
	Qiagen STM®	De 15 à 30°C jusqu'à 2 semaines * A -20°C jusqu'à 13 semaines *	
	Greiner BioOne PapilloCheck® Collection Kit	De 18 à 24°C jusqu'à 2 semaines *	

* = Communication de Greiner BioOne au CNR HPV Institut Pasteur, Paris le 5 juin 2013

CNR HPV, Institut Pasteur

Données fournies par le CNR des papillomavirus en juillet 2013

Annexe 5. Extrait du GBEA (Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale)

Extraits relatifs à la phase pré-analytique

III-2. Prélèvement, identification et conservation des échantillons biologiques

2.1. Prélèvement des échantillons biologiques

Le biologiste fournit aux médecins prescripteurs toutes les précisions utiles aux conditions de mise en œuvre des analyses médicales. Les échantillons doivent, dans toute la mesure du possible, être associés à une « fiche de suivi médical » comportant tous les renseignements nécessaires à la bonne exécution des analyses et à l'interprétation des résultats. Un « modèle type » minimal de cette fiche figure en annexe B. Le support de cette fiche peut être électronique.

Cette fiche de suivi médical doit être demandée au médecin prescripteur par le directeur de laboratoire, chaque fois qu'elle est utile pour préciser la prescription ou pour la bonne exécution des analyses ou pour l'interprétation des résultats.

A N N E X E B
FICHE DE SUIVI MEDICAL
(recommandée mais non obligatoire)
DOCUMENT CONFIDENTIEL

Identification du patient (*)

Nom : Prénom : Sexe

Nom de jeune fille :

Date de naissance :

Adresse ou service d'hospitalisation

Prescription

Médecin prescripteur : Date de la prescription :

Degré d'urgence : Normal Urgent Prioritaire

Le prélèvement peut être effectué par le médecin prescripteur, par le biologiste ou par du personnel qualifié et autorisé conformément à la réglementation en vigueur. Ces personnes doivent être formées aux procédures de prélèvement du laboratoire et informées des risques d'erreurs sur les résultats d'analyses consécutives à la réalisation déficiente du prélèvement et à la nécessité de préciser au biologiste responsable tout incident survenu au cours du prélèvement.

Le biologiste vérifie la conformité des échantillons biologiques acceptés dans son laboratoire. Il doit refuser tout échantillon prélevé ou transmis dans des conditions non conformes aux procédures techniques et réglementaires. Le motif de ce refus sera porté à la connaissance du médecin prescripteur. Lorsqu'il s'agit d'un prélèvement difficile ou unique, les critères d'acceptation doivent être appréciés avec circonspection ; le résultat doit faire mention de ces éventuelles réserves si cela est nécessaire. Chaque fois que cela est possible, il est souhaitable que le prélèvement soit effectué au laboratoire.

Le prélèvement doit être réalisé en règle générale avec du matériel stérile à usage unique. Le récipient destiné à recevoir l'échantillon biologique doit être adapté à la nature de l'échantillon et à celle des analyses. En particulier, la nature du récipient, son système de fermeture, la nature et la quantité ou la concentration des substances adjuvantes qu'il peut contenir doivent être connus et précisés en fonction de l'échantillon auquel ils sont destinés. Le récipient doit être conçu pour éviter tout risque de contamination et de pollution.

2.2. Identification des échantillons :

2.2.1. Cas général :

2.2.1.1. Tubes ou récipients primaires

L'étiquetage des récipients contenant l'échantillon biologique doit être fait au moment du prélèvement par la personne ayant réalisé celui-ci. L'étiquetage doit être conçu pour éviter toute erreur sur l'identité de la personne. Il doit mentionner, outre l'identité et la date de naissance, déclinées par le patient lui-même dans la mesure du possible, le nom de jeune fille si une procédure le prévoit, le sexe, la nature de l'échantillon, le nom du préleveur, la date et, chaque fois qu'une procédure le prévoit, l'heure du prélèvement et/ou sa localisation.

Si la taille du tube ne permet pas l'apposition d'une étiquette comportant l'ensemble des renseignements précités, ce tube étiqueté est placé dans un récipient individuel où toutes les indications ci-dessus sont mentionnées de façon à éviter toute erreur.

Le biologiste doit mettre en place une procédure permettant de lier l'échantillon biologique au patient, même si l'identité de celui-ci est incomplète ou approximative, ou lorsque l'anonymat est souhaité. Cette procédure indiquera également la marche à suivre si l'échantillon biologique fourni par le préleveur ne possède aucune identification.

Si un étiquetage code-barres est utilisé, il ne doit pas masquer les renseignements énoncés en clair et figurant au premier alinéa du présent article. Si l'apposition de l'étiquetage code-barres est confiée à du personnel différent de celui ayant réalisé le prélèvement, des procédures strictes doivent permettre d'éviter toute erreur d'identification.

2.2.1.2. Tubes ou récipients secondaires

Lors de la préparation de fractions aliquotes, l'étiquetage des tubes ou récipients secondaires doit se faire selon les procédures rigoureuses permettant l'identification sans ambiguïté de chaque échantillon au sein du poste de travail ou du poste de stockage.

2.2.3. Transport et transmission des échantillons

Le transport des échantillons doit respecter des règles qui assurent l'intégrité de l'échantillon et la sécurité des personnels.

Celles-ci s'appliquent aussi aux échantillons qui transitent par une pharmacie. Des procédures et des modes opératoires écrits par le laboratoire qui effectue l'analyse doivent fixer les conditions particulières de délai de transport, de température de conservation et d'intégrité de l'emballage des échantillons biologiques.

Des indicateurs de durée de transmission et de rupture de la chaîne du froid doivent être mis en place lorsque les modalités de l'analyse le prévoient. Le biologiste transmetteur doit s'assurer du respect de ces conditions.

Le transport des échantillons biologiques doit s'effectuer le plus rapidement possible au laboratoire en prenant toutes les précautions pour éviter les risques de contamination et de dégradation des constituants.

Le ou les récipients étanches contenant les échantillons biologiques doivent être insérés dans une boîte étanche, tapissée par un matériau absorbant et l'ensemble placé dans un emballage extérieur résistant, portant les noms et adresses du laboratoire destinataire et de l'expéditeur.

L'étiquetage et la résistance des emballages doivent être conformes à la réglementation en vigueur concernant le transport des matières dangereuses (en particulier : arrêté du 5 décembre 1996 relatif au transport des marchandises dangereuses par route, modifié par les arrêtés du 16 décembre 1997, du 27 février 1998 et du 17 décembre 1998).

Ces règles s'appliquent quels que soient la qualité du préleveur, l'origine des prélèvements et le mode de transport utilisé.

Si l'échantillon doit être transmis à un autre laboratoire, la « fiche de suivi médical » (cf. paragraphe III-2.1 et annexe C) ou sa copie ou, à défaut, une fiche de renseignements établie par le biologiste doit être associée.

Les dates et les heures de réception des échantillons biologiques au laboratoire destinataire doivent être enregistrées.

2.3. Conservation des échantillons

Les conditions de conservation doivent être conformes aux règles de sécurité et d'hygiène en vigueur pour éviter toute contamination du personnel ou toute pollution.

Les échantillons de calibrage et de contrôle doivent être conservés avec soin dans les conditions précisées par le fabricant.

La période de validité doit être respectée, en particulier pour les échantillons reconstitués à partir des substances lyophilisées, qui doivent porter la date et l'heure de reconstitution. Toutes les précautions doivent être prises pour éviter les phénomènes d'évaporation et de contamination.

Avant exécution des analyses, si celles-ci sont différées, les échantillons et leurs fractions aliquotes doivent être conservés dans des conditions qui préservent leur qualité.

La congélation de fractions aliquotes obtenues après reconstitution d'échantillons lyophilisés engage la responsabilité du biologiste.

Après exécution des analyses, les échantillons peuvent être conservés pour permettre une comparaison ou une vérification ultérieures. Cette conservation est d'ailleurs obligatoire pour certains examens précisés en annexe C du présent guide.

Les conditions d'identification, de fermeture des récipients et de température de conservation doivent être rigoureusement observées pour éviter tout risque d'erreur, de modification qualitative et/ou quantitative et de contamination. La durée de conservation pour chaque cas particulier doit, si elle n'est pas réglementée, être fixée par le biologiste et inscrite sur les procédures opératoires.

B - Cas particulier des examens utilisant les techniques de biologie moléculaire

2. Réalisation des examens

Le prélèvement et le transport des échantillons biologiques ainsi que l'exécution des analyses doivent répondre aux règles générales énoncées au paragraphe III-2 du présent texte. Des conditions particulières au type d'analyse sont susceptibles d'être fixées par des procédures et modes opératoires spécifiques.

Les techniques analytiques doivent :

- soit utiliser des réactifs conformes à la réglementation en vigueur et employés selon le mode opératoire préconisé par le fabricant ;
- soit utiliser des réactifs préparés dans le laboratoire même. Dans ce cas, ces techniques devront être validées scientifiquement, s'appuyer sur des références bibliographiques et faire l'objet de procédures et de modes opératoires détaillés.

3. Expression des résultats

Le laboratoire doit rendre les résultats en indiquant :

- le nom du réactif enregistré utilisé (ou de la technique utilisée à défaut de réactif enregistré) ;
- le cas échéant, la valeur seuil de positivité de la technique ;
- les unités de mesure pour les analyses quantitatives ;
- le cas échéant, les résultats antérieurs, notamment lors d'un suivi thérapeutique.

Extraits relatifs à l'évaluation de la qualité

2. L'évaluation externe de la qualité (EEQ)

2.1. Le contrôle de qualité national

Ce terme correspond au programme d'évaluation externe de la qualité défini par le décret no 94-1049 du 2 décembre 1994 relatif au contrôle de qualité des analyses de biologie médicale pris en application de l'article L. 761-14 du code de la santé publique. Il s'agit d'un auto-contrôle qui doit se dérouler dans un climat de confiance réciproque. Les résultats individuels produits lors de ce contrôle sont confidentiels et ne peuvent être communiqués aux autorités sanitaires que dans les conditions prévues par les textes.

La participation au programme national d'évaluation externe de la qualité est obligatoire. Il est rappelé que tout refus de participation, ou toute insuffisance de participation, est susceptible de déclencher des sanctions pénales prévues par l'article L. 761-18 du code de la santé publique.

Une participation loyale est indispensable pour qu'elle soit utile. Cette participation doit être un reflet exact de la pratique.

Une optimisation artificielle des résultats du contrôle est inutile pour le laboratoire et nuisible pour la collectivité.

Une participation rigoureuse, reflétant la pratique du laboratoire, est indispensable pour l'utilité de cette évaluation. Les résultats de celle-ci seront en effet très importants pour l'analyse globale qui sera effectuée au niveau national.

Les résultats individuels et globaux de l'évaluation externe de la qualité sont analysés collectivement par toute l'équipe du laboratoire afin de remédier aux erreurs qui pourraient être objectivées. L'étude critique des anomalies détectées par le contrôle de qualité peut induire la remise en cause de la méthode utilisée au laboratoire. Il peut aussi être utile d'engager un dialogue avec les responsables du contrôle de qualité pour éclaircir les raisons d'un résultat discordant inexpliqué. Une trace des décisions induites par les résultats de l'évaluation externe de la qualité doit être conservée en même temps que sont archivés les comptes rendus individuels du laboratoire pendant cinq ans.

La rigueur de cette démarche se justifie parce qu'elle aboutit à une bonne information des biologistes sur la qualité de leurs prestations. Ces informations permettent aux biologistes de corriger les anomalies mises en évidence. Lorsque les résultats du contrôle de qualité d'un laboratoire présentent des anomalies répétées ou importantes au regard de leur utilisation

médicale, le cas de ce laboratoire est soumis anonymement à la commission chargée du contrôle de qualité qui se prononce sur le caractère de gravité de ces anomalies. Lorsque celles-ci sont jugées graves, le laboratoire est obligatoirement signalé par le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé au ministre chargé de la santé à qui il communique les résultats, en vue de réaliser un contrôle plus approfondi prévu à l'article L. 761-13 du code de la santé publique.

2.2. Autres contrôles externes de qualité :

Il est recommandé que le laboratoire participe à des contrôles de qualité externes organisés par des sociétés scientifiques, des groupements de biologistes ou tout autre organisme présentant les garanties nécessaires.

3. Contrôle de qualité interne

Le contrôle de qualité interne est indispensable pour permettre de déceler les anomalies et les erreurs des mesures pour y remédier immédiatement. Il est organisé par le biologiste.

Il comporte toutes les mesures destinées à vérifier les différentes phases de l'activité permettant l'obtention des résultats, et notamment l'analyse d'échantillons de contrôle effectuée dans les mêmes conditions que celles appliquées aux échantillons biologiques.

Les procédures opératoires doivent préciser la fréquence de passage des échantillons de contrôle et les valeurs acceptables pour chaque constituant. Elles doivent également comporter les instructions concernant les mesures à prendre en cas d'anomalies constatées.

Il est rappelé que les échantillons de contrôle ne peuvent en aucun cas se substituer aux échantillons de calibrage des mesures et, inversement, les échantillons de calibrage ne peuvent être utilisés en même temps comme échantillon de contrôle.

Dans les disciplines mettant en œuvre un examen macroscopique et/ou microscopique, il est utile de conserver les pièces pathologiques ayant servi au diagnostic pouvant constituer un élément de référence.

Extraits relatifs à la transmission des résultats

5.1. Elle doit se conformer à la législation et à la réglementation en vigueur et assurer le respect du secret professionnel. Les résultats d'analyses sont remis au patient en main propre ou lui sont envoyés sous pli cacheté, à son nom et à l'adresse qu'il communique. Les résultats d'analyses peuvent également être transmis au médecin prescripteur du patient, sauf opposition de ce dernier. Les résultats peuvent être remis à une tierce personne dûment mandatée par le patient.

5.2. Un résultat laissant présager un pronostic grave ou fatal ne doit être révélé qu'avec la plus grande circonspection.

Si les résultats ne peuvent pas être communiqués au médecin prescripteur (changement de médecin, analyses effectuées à l'initiative du biologiste ou ajoutées à la demande du patient), le biologiste doit demander au malade de lui désigner le médecin à qui il souhaiterait voir remettre les résultats.

Si aucun médecin n'est désigné, il appartient au biologiste d'informer lui-même le patient avec d'autant plus de prudence et sensibilité que les résultats sont préoccupants.

Tout résultat préoccupant que le biologiste est amené à remettre ne peut être communiqué au patient qu'en main propre et au cours d'un entretien particulier. Le biologiste doit alors inciter le patient à consulter un médecin traitant le plus rapidement possible.

Annexe 6. Tableaux d'analyse des études

Tableau 4. Impact de la technique de prélèvement et du matériel utilisé pour le prélèvement sur la détection d'HPV.

Auteurs	Nombre de patientes ou d'échantillons	Type de prélèvement	Composition brosse et/ou écouvillon	Technique de prélèvement cervical	Technique détection HPV et /ou génotypage	Résultats
T. Krech et al , 2009 {krech 2009 76}	494 patientes	Vaginal (n=494) Vaginal et cervical (n=119)	Comparaison écouvillons en rayonne vs Nylon™ floqué	Rotation 360°	Détection : HC2 Génotypage : Linear Array HPV Genotyping [Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne]	<p>Détection d'HPV</p> <p><u>Prélèvements vaginaux</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 70 échantillons vaginaux positifs par HC2 - 69 recueillis avec les écouvillons en nylon floqués [14 %], - 37 [7,5 %] avec les écouvillons en rayonne • 1 prélèvement vaginal positif avec l'écouvillon en rayonne et négatif avec l'écouvillon floqué. (Le prélèvement cervical de cette patiente était négatif avec les 2 types d'écouvillons) <p><u>comparaison prélèvements vaginaux et cervicaux</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 14 HPV HR +/119 femmes ayant à la fois un prélèvement vaginal et un cervical • 4 échantillons+ : 6 patientes • 3 échantillons+ : 3 patientes • 2 échantillons+ : 5 patientes • <p><u>Génotypage HPV réalisé chez les 6 patientes dont les 4 échantillons étaient HPV HR positifs</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • concordance totale des prélèvements vaginaux avec les 2 types d'écouvillons par contre une différence a été observée pour les prélèvements cervicaux de 2 des 6 patientes avec plus de génotypes détectés avec l'écouvillon rayonne.
D M F, et al, 2003	Etude longitudinale chez 103 patientes	1189 prélèvements cervicaux-vaginaux déchargés dans du milieu PreserCyt et	- Ecouvillons en dacron - tampon vaginal	écouvillonnage	PCR MY09-MY11-HMB01 L1 consensus suivi d'un blot (Roche)	- 14 prélèvements programmés par patiente : -- 1 échantillon ectocervical et 1 endocervical réalisés par un médecin à l'inclusion, des auto-prélèvements réalisés à l'aide de 2 écouvillons

Auteurs	Nombre de patientes ou d'échantillons	Type de prélèvement	Composition brosse et/ou écouvillon	Technique de prélèvement cervical	Technique de détection HPV et /ou génotypage	Résultats
{Harper 2003 184}		conservés à température ambiante - cervicaux réalisés par un médecin - vaginaux réalisés par auto-prélèvement				vaginaux consécutifs, un seul écouvillon vaginal et 1 tampon à l'inclusion puis répétés à domicile 3 fois sur 4 à 6 semaines. - 1189 prélèvements cervico-vaginaux obtenus - Au moins 1/14 prélèvement positif : 43.7 % (45 patientes) - Aucun prélèvement positif : 49.5 % (51 patientes) - 54.6 % (56 patientes) histologie CIN -1 seul écouvillon ou un tampon détecte 10 à 35 % de moins d'HPV HR que le prélèvement vaginal réalisé à l'aide de 2 écouvillons consécutifs ($p < 0.025$) -La moins bonne détection d'HPV avec les tampons que cela soit par rapport à un ou à 2 écouvillons vaginaux et au prélèvement cervical s'expliquerait par un nombre de cellules recueilli très important qui inhiberait la PCR (OR= 0.87 pour 2 écouvillons consécutifs $p=NS$, OR= 0.71 auto prélèvement avec un écouvillon ($p=0.023$), OR=0.66 pour le prélèvement à l'aide du tampon ($p=0.009$)).
Depuydt et al 2006 {Depuydt 2006 131}	Série consécutive de 100 patientes (2 prélèvements par patiente)	1-Prélèvement cervical déchargé dans du milieu SurePath®. 2-Prélèvement cervicale et endocervical déchargé dans du milieu SurePath®.	1-cyto-brosse cervicale classique (Cervex Brush®) 2-une brosse « Cervex Brush® Combi » (Rovers Medical Devices)	1-Rotation 5x 360° avec Cervex Brush® 2-2x 360° avec Cervex Brush® Combi	19 PCR en temps réel TaqMan quantitatives différentes comprenant une amplification du gène de la bêta-globine.	<p><u>Charge virale médiane HPV :</u> Significativement plus élevée pour la brosse combi, 0.1825 copies/cellule vs 0.0042 pour la brosse classique (P = 0.02).</p> <p><u>Nombre médian de cellules malpighiennes recueillies/lame :</u> ne diffère pas selon les 2 brosses : 54 963 versus 54 595 cellules par lame.</p> <p><u>Nombre de cellules endocervicales/lame :</u> significativement plus élevé avec la brosse Combi 981 vs 371 ($p=0.00001$)</p> <p><u>Détection des frottis anormaux</u> La brosse « Combi » a permis la détection d'un plus grand nombre de frottis LSIL (3 versus 2) et d'ASCUS (6 versus 3).</p> <p><u>Détection HPV</u> Dans le groupe prélevé avec la brosse classique 60 % (3/5) des frottis anormaux ont été trouvés positifs en HPV HR versus 66.7 % (6/9) avec la brosse Combi</p>

Tableau 5. Impact du site de prélèvement.

Auteurs	Nombre de patientes ou d'échantillons	Sites de prélèvement comparés	Technique détection HPV et /ou génotypage	Résultats
T. Krech, 2009 {krech 2009 76}	494 patientes	Vaginal et cervical (494 patientes ayant eu un prélèvement vaginal dont 119 ont eu un prélèvement Vaginal et cervical)	Détection : HC2 Génotypage : Linear Array HPV Genotyping [Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne]	comparaison prélèvements vaginaux et cervicaux <ul style="list-style-type: none"> • 14 HPV HR +/119 femmes • 4 échantillons+ : 6 patientes • 3 échantillons+ : 3 patientes • 2 échantillons+ : 5 patientes - Pour les 105 patientes HPV - : concordance 100 % - Pour les 14 patientes HPV + : concordance 64,3 % [9/14] - concordance totale de 95,8 % [114/119]. Génotypage HPV réalisé chez les 6 patientes dont les 4 échantillons étaient HPV HR positifs (2 cervicaux et 2 vaginaux). - nombre de types d'HPV retrouvé au niveau cervical plutôt inférieur à celui retrouvé au niveau vaginal mais différence non significative.
D M Harper, <i>et al</i> 2003 {Harper 2003 184}	Etude longitudinale chez 103 patientes	1189 prélèvements cervicaux-vaginaux déchargés dans du milieu PreserCyt et conservés à température ambiante - cervicaux réalisés par un médecin - vaginaux réalisés par auto-prélèvement	PCR MY09-MY11-HMB01 L1 consensus suivi d'un blot (Roche)	- 14 prélèvements programmés par patiente : 1 échantillon ectocervical et 1 endocervical réalisés par un médecin à l'inclusion, des auto-prélèvements réalisés à l'aide de 2 écouvillons vaginaux consécutifs, un seul écouvillon vaginal et 1 tampon à l'inclusion puis répétés à domicile 3 fois sur 4 à 6 semaines. - 1189 prélèvements cervico-vaginaux obtenus - L'auto-prélèvement avec 2 écouvillons vaginaux est équivalente au prélèvement cervical (OR =0.87, p=NS)
Twu <i>et al</i> 2011 {Twu 2011 53}	252 patientes	- prélèvement cervical réalisé par un médecin - auto prélèvement vaginal	Nested PCR My11/MY09 GP5+/GP6+ puis blot	- Le taux d'HPV+ à partir des prélèvements vaginaux est de 27.4 % versus 30.2 % pour les cervicaux. Avec une mauvaise concordance entre les blots HPV au niveau vaginal et cervical (k=0.37) - 23 génotypes différents sont retrouvés au niveau vaginal et 22 au niveau cervical -Les prélèvements vaginaux détectent moins HPV HR que les cervicaux (15,9 % des échantillons vaginaux et 23,8 % des cervicaux p = 0,01). -HPV 52 et 16 sont les plus couramment retrouvés et sont plus souvent

Auteurs	Nombre de patientes ou d'échantillons	Sites de prélèvement comparés	Technique détection HPV et /ou génotypage	Résultats
				<p>détecté dans les échantillons cervicaux (10,3 % vs 6,3 % et 5,6 % versus 4,4 % respectivement. Pour tout autre type HPV HR il n'y a aucune différence de détection entre les 2 sites</p> <ul style="list-style-type: none"> - La détection des CIN 3 dans les prélèvements vaginaux était de 75,0 % (IC à 95 %, de 47.6 à 92.7 %) et dans les prélèvements cervicaux de 87,5 % (IC à 95 %, de 61,6 à 98,4 %), (P = 0,48). - Le génotypage met en évidence moins d'HPV HR dans les prélèvements cervicaux que vaginaux (23.8 % vs 15.9 %)
<p>Roberts <i>et al</i> 2009 {Roberts, 2009 79}.</p>	<p>898 patientes</p>	<p>3 sites: endo-ecto col, labial / vulve / périnée lavage vaginal écouvillons déchargés dans du milieu STM Solution saline (10 ml) pour le lavage vaginal</p>	<p>PCR « maison » pour détection des HPV6, HPV11, HPV16, HPV18</p>	<p>232 femmes HPV positives dans au moins un des sites de prélèvements</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3 sites de prélèvement positifs : HPV6 : 70,4 %, HPV11, : 40,0 %, HPV16, : 65,3 % HPV18 : 64,1 % - 13 patientes trouvées positives en un seul site en HPV6 + : site labial/vulve/périnée dans 12 cas et du lavage vaginal dans un cas, - 3 patientes trouvées positives en un seul site en HPV11 + : site labial/vulve/périnée dans 1 cas, du lavage vaginal dans un cas et du prélèvement cervical dans un cas, - 22 patientes trouvées positives en un seul site en HPV16 + : site labial/vulve/périnée dans 15 cas, du lavage vaginal dans 3 cas et du prélèvement cervical dans 4 cas, - 11 patientes trouvées positives en un seul site en HPV18 + : site labial/vulve/périnée dans 8 cas, du lavage vaginal dans 2 cas et du prélèvement cervical dans un cas <p>concordance de détection des types HPV 6, 11, 16 et 18</p> <ul style="list-style-type: none"> - site labial/vulve/périnée versus lavage vaginal - prélèvement cervical versus lavage vaginal - site labial/vulve/périnée versus prélèvement cervical. <p>Très bonne concordance des génotypes entre les différents sites de prélèvement a été retrouvée sauf pour le type 6 qui est retrouvé plus fréquemment de façon significative dans les échantillons labial / vulve / périnée (par rapport au prélèvement cervical p=0.0008 et au lavage vaginal p=0.0095).</p>

Tableau 6. Impact de la composition du milieu sur les résultats des tests de détection et/ou génotypage.

Auteurs	Milieux	Milieu de référence	Nombre de patientes	Durée conservation	Techniques recherche HPV	Corrélations	Discordances
Pretet, 2010 {Pretet 2010 31}	<p>Les échantillons sont prélevés dans du milieu Novaprep (NVP).</p> <p>Ils sont centrifugés 5 min à 1000 g à température ambiante puis les culots cellulaires sont lavés dans 1 ml de PBS et remis en suspension dans 200 µl de STM et 100µl de solution de dénaturation. puis incubés à 65° C pendant 90 min.</p>	STM	134 (99 paires de brosses cervicales comparées)	1-2 mois	HC2 et inno-lipa	<p>Détection HPV HR : 72 % avec NVT vs 82 % STM</p> <p>Globalement en considérant les échantillons détectés positifs par HC2 et Inno-Lipa la concordance entre les deux milieux est de 99 % ($\kappa = 0,97$).</p> <p>L'étude a également évalué le taux de positivité avec le test HC2 en prenant en compte le milieu, la cytologie et l'histologie. Il n'y a pas de différence en fonction du milieu dans le taux de positivité HC2-NVT et HC2-STM pour les échantillons LSIL et HSIL (détection 80 % CIN1, 93 % CIN2 et 100 % CIN3)</p>	<p>6 paires discordantes Douze échantillons (6 paires) discordants et 11 ont pu être génotypés (3 NVT-/STM+ et 3 NVT+/STM-)</p> <p>Des différences sont observées pour les 5 paires dont les résultats des génotypes obtenus à partir des 2 milieux (NVT /STM) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - paire 1 : 16, 31/16 - paire 2 : 16, 52/16 - paire 4 : 52/51, 52 - paire 5 : 31, 51/31, 33 - paire 4 : 56/51
Castle, 2004 {Castle 2007 204}	Rince bouche	PreservCyt	34	4 mois	Linear Array HPV genotyping test (Roche Molecular Systems) et AMPLICOR MWP dosage (Roche)/ retestées par HC2	<p>Concordance des résultats obtenus à partir des 2 milieux par le test AMPLICOR MWP ≥ 94 % avec $\kappa \geq 0.88$.</p> <p>Concordance des 37 génotypes recherchés par le test Linear Array HPV genotyping (non carcinogène, carcinogène, HPV 18,</p>	<p>Pour les échantillons CIN 3 tous les résultats étaient positifs par le test AMPLICOR MWP à J0, à 21 et 42 jours de conservation à partir des deux milieux de transport et par le test HC2.</p> <p>Génotypes retrouvés chez les patientes classées CIN 3</p>

Auteurs	Milieux	Milieu de référence	Nombre de patientes	Durée conservation	Techniques recherche HPV	Corrélations	Discordances
						<p>HPV16, HPV HR autres que 16 et 18) était globalement \geq 74 % (79 % à J0, 74 % à 21 jours et 76 % à 42 jours).</p> <p>Corrélation avec le test HC2 après 4 mois de conservation était élevée (coefficient de Spearman= 0,91) et la concordance de 88 % ($\kappa=0,77$, $p=0,6$) {Castle, 2007, 204}.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - HPV 31 pour une des patientes (même résultat avec les deux milieux de transport) - HPV 16 et 42 pour une patiente avec une différence retrouvée entre les deux milieux de transport avec détection des types 16 et 42 à partir du milieu PreservCyt et uniquement du type 16 à partir du liquide rince bouche <p>Génotypes retrouvés chez les patientes classées CIN 2</p> <ul style="list-style-type: none"> - HPV 16 pour une patiente quel que soit le milieu et la durée de conservation - HPV 42, 81, 84 et 89 pour 1 patiente à partir du liquide rince bouche aux trois périodes de conservation alors que du type HPV52 a à partir du milieu PreservCyt et uniquement à J0 - HPV 31 et 66 pour 1 patiente à partir du liquide rince bouche uniquement à 42 jours de conservation alors qu'ils étaient retrouvés à J0, à 21 et 42 jours à partir

Auteurs	Milieux	Milieu de référence	Nombre de patientes	Durée conservation	Techniques recherche HPV	Corrélations	Discordances
							<p>du milieu PreservCyt.</p> <p>Comparaison avec la technique HC2 : résultats variables</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 patiente présentant un résultat positif à partir du liquide rince bouche et négatif à partir du milieu PreservCyt, - 1 patiente présentant un résultat positif à partir des deux milieux - 1 patiente présentant un résultat négatif à partir des deux milieux).
Taha NS, 2006 {Abrahamo Taha 2006 230}	Universal collection medium (UCM)	STM	893		HC2	Détection HPV HR milieu STM : 29,9 % (267/893) et 29,6 % pour UCM (264/893) ($\kappa = 0,92$),	14 UCM+ STM- 17 UCM- STM+
Leduc, 2004 {Leduc 2004 27}	Easyfix	kit Cervical Sampler™ Digene	256		HC2	concordance pour 215 cas (121 HPV/E+ et HPV/C+, 94 HPV/E - et HPV/C -) coefficient kappa = 0,74). khi2 =2,44	discordance pour 41 cas (26 HPV/E - et HPV/C +, 15 HPV/E + et HPV/C -).
Gudleviciene 2007 {Gudleviciene, 2007, ID.}	Shandon PapSpin™ (Thermo Shandon, Pittsburg, Pennsylvania, USA)	PBS	2495 contrôle de qualité interne. : 10 % des femmes choisies au hasard (n = 16) ont été re-testées en HPV	-20°C	PCR utilisant les amorces consensus MY09 / MY11.		<p>Concentration d'ADN extrait échantillons prélevés en milieu PapSpin : 11,1 pg/ml contrôles en PBS : 67,5 pg /ml (p <0,0001)</p> <p>Détection des HPV positifs - 5,6 % (9/160) des échantillons en milieu PapSpin</p>

Auteurs	Milieus	Milieu de référence	Nombre de patientes	Durée conservation	Techniques recherche HPV	Corrélations	Discordances
							<ul style="list-style-type: none"> - 8/16 (50 %) contrôles en PBS (p<0.000001) - Tous les contrôles HPV+ étaient négatifs avec le milieu PapSpin (3 échantillons de contrôles positifs ont été classés LSIL, 3 HSIL et 2 ASC-H).

Tableau 7. Impact de la durée et de la température de conservation de l'échantillon avant la réalisation des tests de détection d'HPV.

Auteurs	Nombre d'échantillons	Durée conservation	Température conservation	Test de détection	Concordance
Hardie 2003 {Hardie 2003 213}	796 prélèvements cervicaux	Délai médian de 14 jours au site R (de 8 à 27 jours) et de 16 jours (7–28 jours) pour le site A.	Site A : prélèvements dans Milieu BD SurePath® conservé à température ambiante (399 échantillons) Site R : prélèvements conservés et transportés réfrigérés entre 4 et 10 °C (397 échantillons)	HC2 et AMPLICOR	Concordance entre les échantillons du site A et du site R 0 et 14 jours : 82 % 15 à 21 jours : 92 % 22 à 29 jours : 85 % <ul style="list-style-type: none"> 3 échantillons invalides (absence d'amplification du contrôle de β-globine) au site A par le test AMPLICOR (2 HC2- et 1 HC2+) aucun échantillon invalide sur le site B
Saillors 2004 {Saillors 2004 156}.	207 prélèvements	21 jours de conservation puis testés de nouveau après 2.5 à 13.5 mois de conservation	Ajout de la solution de dénaturation puis conservation à -20°C	HC 2	<ul style="list-style-type: none"> 127 patientes HPV HR+ lors du 2ème test/134 patientes trouvées positives lors du premier test Parmi les 73 patientes trouvées négatives lors du premier test, 21 ont été trouvées positives HPV HR lors du 2ème test et 52 négatives ; concordance globale 86 % ($\kappa=0,69$) pas de différence au cours du temps (87 % pour les 90 échantillons ayant 3 mois de conservation à 92 % pour les 25 échantillons ayant 13,5 mois de conservation)
Castle 2003 {Castle 2003 198}	90 prélèvements LSIL recueillis dans du milieu PreservCyt®	Echantillons conservés dans du milieu PreservCyt® à température ambiante. vs milieu STM. et congelés à -70°C. 30 échantillons ayant respectivement 1an, 5 ans et 8 ans ont été testés par HC2 et pour le gène de la β -globine	Conservation à -70°C	HC2	<ul style="list-style-type: none"> Aucune différence de sensibilité de détection de l'ADN HPV ($p=0,6$) 12/30 échantillons ayant 8 ans de conservation comparés aux échantillons congelé en STM : concordance de 11/12 (1 seul échantillon PreservCyt® +/STM-). Stabilité du gène de β-globine au cours du temps avec 3 % d'échantillon non détecté à 1 an de

					<p>conservation, 14 % d'échantillons non détectés à 5 ans de conservation, 10 % d'échantillons non détectés à 8 ans de conservation.</p> <ul style="list-style-type: none">• conservation des acides nucléiques viraux diminue au cours du temps : aucun d'échantillon non satisfaisant à 1 an de conservation, 14 % d'échantillons non détectés à 5 ans, 41 % d'échantillons non détectés à 8 ans.
--	--	--	--	--	---

Tableau 8. La libération des acides nucléiques.

Auteurs	Nombre échantillons	Techniques extraction	Techniques de détection	Volume ADN amplifié	Volume échantillon	Résultats
Rabelo-Santos 2005 {Rabelo-Santos 2005 220}	- 92 échantillons cervicaux (dont 84 HPV positifs par HC2) - recueillis et stockés dans du milieu STM et ayant été traités par le réactif de dénaturation puis congelés à -20°C pendant 18 mois	<ul style="list-style-type: none"> Précipitation de 450 µl échantillon dénaturé par 2 ml NaAc 3 M, pH 5,2, 200 µg de glycogène et 100 ml d'éthanol absolu puis congelés à -70 °C une nuit Centrifugation le lendemain 12.000g pendant 15 min à 4°C. Rincage du culot dans 400 µL d'éthanol à 70 %, puis centrifugé à 3000g pendant 5 min puis solubilisé dans 100 à 200 µL de solution de Tris 1 mM EDTA 100 uM, pH 8,2). Extraction automatisée sur Magna Pure LC, Roche et le kit d'extraction d'ADN Magna Pure LC isolement. 	HC2		450 µL	Amplification de la β-globine 83 / 92 (90 %). 56/84 HPV+ après 18 mois de conservation (67 %)
Peevor 2011 {Peevor 2011 55}	883 échantillons recueillis dans du milieu Thinprep et SurePath®	<ul style="list-style-type: none"> Digestion par protéinase K : 10µl Protéinase K +100µl de culots cellulaires, incubés à 56 °C pendant 2 h, puis 80°C pendant 10 min puis 4 °C pendant 10 min puis centrifugés à 11,337xg, 4 °C pendant 10 min Extraction QIAampMinElute kit (Qiagen, Hilden, 	HPV PCR ELISA (PCR-EIA) et Greiner Bio-One PapilloCheck® HPV-assay (PapilloCheck®).		<ul style="list-style-type: none"> Centrifugation des échantillons (volumes variables) 3354g 10 min, Reprise du culot cellulaire dans 2 ml tampon 10mMTris (pH 7.4) culot divisé en 2 fractions : <ul style="list-style-type: none"> - 1 congelée à -80°C - 1 reprise dans 	- Efficacité d'extraction identique entre QIAamp et Protéinase K à partir de dilutions de β-globine de 0,5 à 5000 par réaction validation des tests dans 93,3 %.(824/883) 27 positifs avec extraction QIAamp et négatifs par extraction protéinase K et 31 négatifs avec extraction QIAamp et positifs par extraction protéinase K Prévalence d'échantillons

Auteurs	Nombre échantillons	Techniques extraction	Techniques de détection	Volume ADN amplifié	Volume échantillon	Résultats
		<p>Germany) à partir de 100µl de contrôle ou d'échantillon clinique puis élution de l'ADN dans un volume final de 100µl</p>			<p>500µl de tampon 10mM Tris (séparée en 2 aliquots de 100µl qui ont été utilisés pour l'extraction et le reste a été congelé à -80 °C)</p>	<p>invalides (β -globine négative) dans une cohorte de 10.000 patientes : 7 % (676/10.000). Détermination de la cause de non validation pour 379 des 676 échantillons</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nouveau test à partir de l'extrait d'origine a permis de valider le test dans 21,6 % des cas. - Réextraction à partir de matériel stocké a permis la validation de 56,2 % des échantillons. - Dilution (1/10) a permis de valider 51,7 % des extraits d'origine et 28 % des nouveaux extraits. - Le protocole de re-extraction et dilution au 1/10 des échantillons non validés a permis la détection de 4,1 % d' échantillons HPV HR positifs (28 /676) et a permis de réduire le nombre de tests invalides de 7 % à <1 % (n=52)
<p>Depuyd 2006 {Depuyd 2006 131}</p>	<p>100 patientes (200 brosses cervicales, 100 réalisées à l'aide d'une brosse COMBI et 100 à l'aide d'une brosse classique, déchargées dans 10 ml de milieu SurePath®)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Protéinase K avec une adaptation du volume selon la taille du culot cellulaire (50 µl pour les culots <3,0 mm, 100 µl pour les culots > 3,0 et <6,0 mm et 150 µl pour les culots > 6,0 mm). - Les culots cellulaires ont été préparés à l'aide du Robotic AutoCyte PREP system 	<p>19 PCR en temps réel TaqMan quantitatives</p>	<p>1 µl d'ADN extrait par PCR</p>	<p>10 ml de milieu SurePath®. (l'extraction).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - β-globine amplifiée dans tous les échantillons -73 échantillons HPV positifs dont 53 HR - Médiane de charge virale HPV des échantillons obtenus avec la brosse Combi était de 0.1825 copies/cellule et était significativement plus élevée qu'avec la brosse classique (0.0042 copies/cell) (P = 0.02). - Le nombre de cellules malpighiennes recueillies ne diffère pas selon les 2 brosses (54 963 versus 54 595). - Le nombre de cellules

Auteurs	Nombre échantillons	Techniques extraction	Techniques de détection	Volume ADN amplifié	Volume échantillon	Résultats
						endocervicale est significativement plus élevé avec la brosse Combi 981 vs 371 (p=0.00001)
Roberts, 2011 {Roberts, 2011 54}	444	Qiagen Spin blood	Multiplex HPV PCR versus LA modifié	4 µl d'ADN pour PCR multiplex et pour m-LA	200µl	<ul style="list-style-type: none"> - contrôle interne β-globine positif pour 440 échantillons avec PCR multiplex - contrôle interne β-globine positif pour 406 avec le test m-LA - 279 échantillons HPV HR positifs avec la PCR multiplex - 249 échantillons HPV HR positifs avec le test m-LA. Taux de concordance 0.881
	432	Qiagen Spin blood	Multiplex HPV PCR versus LA standard (S-LA)	4 µl d'ADN pour PCR multiplex et 50 µl pour le test LA	200µl	<ul style="list-style-type: none"> - contrôle interne β-globine positif 428/432 avec PCR multiplex - contrôle interne β-globine positif 379/432 avec le test m-LA - 263 échantillons HPV HR + avec la PCR multiplex - 146 échantillons HPV HR + avec le test S-LA Taux de concordance 0.615
	432	Qiagen Spin blood.	s-LA versus m-LA	Comparaison 4 µl d'ADN par PCR versus 50 µl	200µl	<ul style="list-style-type: none"> - contrôle interne β-globine positif 379 /432 avec le test s-LA - contrôle interne β-globine positif 396 /432 avec le test m-LA. - 159 échantillons HPV HR + avec le test s-LA - 265 échantillons HPV HR + avec le test m-LA. Taux de concordance 0.719
	168	Qiagen MinElute media	Multiplex HPV PCR versus s-LA	4 µl pour PCR multiplex et 50 µl pour le test LA	200µl	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle interne β-globine positif 167/168 avec la PCR multiplex - contrôle interne β-globine positif 168/168 par le test LA

Auteurs	Nombre échantillons	Techniques extraction	Techniques de détection	Volume ADN amplifié	Volume échantillon	Résultats
						- 127 échantillons HPV HR + avec la PCR multiplex - 157 échantillons HPV HR + avec le test S-LA Taux de concordance 0.760
E P Dixon, 2010 {Dixon, 2010 71}	7 pools LSIL et 7 pools de cellules SiHa infectées par HPV16 dans du milieu SurePath® conservés à température ambiante moins de 21 jours.	- Lyse/digestion par la protéinase K. puis extraction par le kit AmpliLute - Optimisation du protocole d'extraction par une étape de pré-lavage du culot cellulaire par du PBS puis centrifugation à 14.100g 3 mn puis reprise du culot cellulaire dans 2 ml de PBS dont 250 µl ont été utilisés pour l'extraction AmpliLute.	AMPLICOR		250µl	- Le protocole d'extraction avec ou sans étape de lavage supplémentaire montre des performances identiques pour la détection des HPV à partir des pools positifs (7/7). - Par contre une étape de lavage supplémentaire impacte la détection du gène de la β-globine (positive pour 5 des 7 pools avec le pré-lavage et 3/7 sans cette étape).
	Echantillons de 146 patientes dans du milieu SurePath® conservés à température ambiante de 21 à 42 jours	-Lyse/digestion par la protéinase K. puis extraction par le kit AmpliLute (protocole optimisé) -	AMPLICOR		250µl	- • Le contrôle interne de β-globine a été détecté pour les 146 échantillons (100 %) • HPV HR détectés dans 42 % (18/39) des ASCUS, 63 % (19/30) des LSIL et 92 % (24/26) des HSIL.

*Protocole LA modifié pour ramener à le volume d'ADN à 4 µl.
 s-LA : protocole standard.
 m-LA protocole modifié.

Tableau 9. Modifications de conditions PCR.

Auteurs	Nombre échantillons	Techniques extraction	Techniques de détection	Modifications technique	Volume d'échantillon	Résultats
E P Dixon, 2010 {Dixon, 2010 72}	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 7 pools LSIL ▪ 7 pools de cellules SiHa infectées par HPV16 ▪ 146 échantillons recueillis sur milieu SurePath® 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 250µl d'échantillon centrifugé à 14,100g pendant 3 min. ▪ culot cellulaire lavé dans 2 ml de PBS. ▪ 250 µl utilisé pour lyse/digestion par la protéinase K. ▪ Extraction par le kit AmpliLute 	AMPLICOR et HC2	Augmentation de la température d'annealing de 54 à 58 °C	250µl	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la température d'annealing permet d'augmenter la détection de la β-globine de 3/7 à 7/7 des pools LSIL. - Pas d'impact de l'augmentation de la température sur la détection des HPV (7/7 pour les 2 températures) - Détection de β-globine : 146 échantillons - Détection HPV HR : 46.2 % (18/39) des ASCUS, 63.3 % (19/30) des LSIL et 92.3 % (24/26) des HSI. - Concordance des résultats par le test AMPLICOR HPV et Hybrid Capture II étaient de 83.9 %.
Roberts, 2011 {Roberts, 2011 54}	432	Qiagen Spin blood.	PCR multiplex Et test Linear Array	4 µl d'ADN par PCR versus 50 µl	200µl	<p>L'utilisation de la même quantité d'ADN/PCR mais testée avec 2 PCR différentes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - contrôle interne β-globine : 440 échantillons détectés avec la PCR multiplex et 406 avec le test LA) - détection d'HPV HR : 279 échantillons positifs avec la PCR multiplex et 249 avec le test LA. <p>La modification de la quantité d'ADN utilisée pour la détection HPV à l'aide du même test Linear Array (4 µl versus 50µl d'ADN par PCR) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - détection du contrôle interne β-globine : 379 avec le test LA

Auteurs	Nombre échantillons	Techniques extraction	Techniques de détection	Modifications technique	Volume d'échantillon	Résultats
						standard et 396 avec le test LA modifié - détection d'HPV HR. : 159 échantillons positifs avec le test s-LA et 265 avec le test m-LA.

Annexe 7. Questionnaire destiné aux experts

Ce questionnaire a servi de base de discussion lors des auditions, il balaye l'ensemble des étapes pré-analytiques relatives aux différents intervenants.

Facteurs susceptibles d'influencer la sensibilité de détection d'HPV	Questions	Influence sur la sensibilité de détection des HPV HR				
		Très important*	Important*	Moyennement important	Peu important	Pas important
Nature du matériel de prélèvement	<i>Quel est l'impact sur la sensibilité de détection ?</i>					
		*Commentaires obligatoire des experts				
	Quel est le matériel (ou les matériels) à privilégier ?					
	Quel est le matériel (ou les matériels) à ne pas utiliser ?					
Technique de prélèvement	<i>Quel est l'impact sur la sensibilité de détection ?</i>					

Facteurs susceptibles d'influencer la sensibilité de détection d'HPV	Questions	Influence sur la sensibilité de détection des HPV HR				
		*Commentaires obligatoire des experts				
	Quel est la technique (ou les techniques) à privilégier ?					
	Quel est la technique (ou les techniques) à exclure ?					
Site de prélèvement	Quel est l'impact sur la sensibilité de détection ?	Très important*	Important*	Moyennement important	Peu important	Pas important
		*Commentaires obligatoire des experts				
	Quel est le site (ou les sites) de prélèvement optimal (aux) ?					
Existe-t-il une répartition cartographique différentielle en fonction des génotypes d'HPV ?						

Facteurs susceptibles d'influencer la sensibilité de détection d'HPV	Questions	Influence sur la sensibilité de détection des HPV HR				
<p>Les recommandations nationales et internationales décrivent les conditions optimales¹ de réalisation d'un FCU à visée cytologique chez les patientes. Ces préconisations doivent-elles s'appliquer aux prélèvements destinés aux tests HPV ?</p>						
<p>Nature et composition du milieu de transport du FCU</p>	<p><i>Quel est l'impact sur la sensibilité de détection ?</i></p>	<p>Très important*</p>	<p>Important*</p>	<p>Moyennement important</p>	<p>Peu important</p>	<p>Pas important</p>
		<p>*Commentaires obligatoire des experts</p>				

¹ ANAES 2002 :

- ▶ le frottis devrait être effectué à distance des rapports sexuels (48 heures), en dehors des périodes menstruelles, de toute thérapeutique locale ou d'infection et si nécessaire après traitement oestrogénique chez la femme ménopausée ;
- ▶ il est important d'expliquer à la patiente le but de l'examen et la technique, et de la rassurer ;
- ▶ il faut éviter de faire le toucher vaginal avant le frottis et d'utiliser un lubrifiant ;
- ▶ avant de faire le frottis, le col doit être correctement exposé à l'aide d'un spéculum ;
- ▶ le prélèvement doit concerner la totalité de l'orifice cervical externe et l'endocol.

Facteurs susceptibles d'influencer la sensibilité de détection d'HPV	Questions	Influence sur la sensibilité de détection des HPV HR				
Première étape	<p>Comment doit-on choisir le milieu de transport au niveau du cabinet ou service de gynécologie,</p> <p>1- si le prélèvement est destiné à la fois à la cytologie et à la recherche d'HPV ?</p> <p>2- si le prélèvement est destiné uniquement au test HPV ?</p>					
Deuxième étape	<p>Comment doit-on choisir le milieu de transport dans le laboratoire d'anatomo-cytopathologie pour les FCU ASC-US à transmettre aux laboratoires de virologie pour la détection d'HPV ?</p>					
Durée de conservation des prélèvements dans le milieu de transport	Quel est l'impact sur la sensibilité de détection ?	Très important*	Important*	Moyennement important	Peu important	Pas important
		*Commentaires obligatoire des experts				
	<p>Quelle est la durée maximale de conservation des prélèvements dans le cabinet/service de gynécologie avant leur transmission au laboratoire d'anatomo-cytopathologie ?</p>					
<p>Quelle est la durée maximale de conservation des échantillons dans le laboratoire d'anatomo-cytopathologie avant leur envoi au laboratoire de</p>						

Facteurs susceptibles d'influencer la sensibilité de détection d'HPV	Questions	Influence sur la sensibilité de détection des HPV HR				
	gie ?					
	Quelle est durée maximale de conservation des échantillons dans le laboratoire de virologie avant la réalisation du test de détection ?					
	Quel est l'impact sur la sensibilité de détection ?	Très important*	Important*	Moyennement important	Peu important	Pas important
Température de conservation des prélèvements dans le milieu de transport						
		*Commentaires obligatoire des experts				
	A quelle température doivent être maintenus les FCU dans le cabinet/service de gynécologie avant transmission au laboratoire d'anatomo-cytopathologie ?					
	A quelle température doivent être maintenus les échantillons dans le laboratoire d'anatomo-cytopathologie avant envoi au laboratoire de virologie ?					
	A quelle température doivent être maintenus les échantillons dans le laboratoire de virologie avant le test ?					

Facteurs susceptibles d'influencer la sensibilité de détection d'HPV	Questions	Influence sur la sensibilité de détection des HPV HR				
Cas particulier des échantillons conservés pour des tests HPV ultérieurs	A quelle température de congélation et pendant combien de temps, les échantillons peuvent être conservés après un premier test de détection ?					
	Existe-t-il des discordances entre le résultat obtenu après conservation et le résultat original ?					
Quelle est l'étape la plus cruciale au niveau de la phase préanalytique ?						
Libération des acides nucléiques	Quel est l'impact sur le sensibilité de détection ?	Très important*	Important*	Moyennement important	Peu important	Pas important
		*Commentaires obligatoire des experts				
	Comment doit-être choisie la technique de libération des acides nucléiques ?					
Existe-t-il d'autres étapes/d'autres facteurs susceptibles d'altérer la qualité des échantillons destinés aux tests de détection du génome d'HPV ?						

Facteurs susceptibles d'influencer la sensibilité de détection d'HPV	Questions	Influence sur la sensibilité de détection des HPV HR
Citez les documents de référence relatifs aux préconisations à respecter pour la réalisation de la phase pré-analytique du test de détection du génome d'HPV (recommandations, textes réglementaires...)		

Annexe 8. Comptes rendus des auditions des experts

Les onze professionnels ayant participé à ce travail (voir liste ci-dessous) ont été auditionnés du 24 au 31 mai 2013, de manière individuelle et sur la base d'un questionnaire préétabli (cf. annexe 7). Leurs propos ont été recueillis et ont fait l'objet de comptes rendus qui ont été validés par chaque expert auditionné.

Compte rendu de l'audition de M^{me} RIVIERE 24 mai 2013

Depuis l'extension des compétences des sages femmes aux consultations préventives de gynécologie², celles-ci sont autorisées à réaliser un FCU de suivi gynécologique en dehors du cadre de la grossesse.

Interrogée sur la pratique sur le terrain et en particulier sur les enseignements dispensés en écoles de sages-femmes, M^{me} Rivière confirme qu'avant la réalisation d'un FCU, les sages femmes suivent les recommandations en vigueur, notamment en recueillant les Eléments anamnestiques concernant la patiente ainsi que tous les facteurs cliniques et/ou physico-chimiques susceptibles d'impacter la qualité du FCU.

Le site de prélèvement privilégié et recommandé au cours de la formation, est la zone de transformation.

Concernant le matériel de prélèvement et la technique de prélèvement, hormis la contrainte d'utilisation de dispositifs en plastique pour les FCU en phase liquide, le choix du matériel dépendra de la structure d'exercice et de ses contraintes organisationnelles :

- Pour les établissements de santé, le choix du matériel est réalisé dans le cadre d'une concertation avec les différents services concernés (gynécologie, cytologie et biologie) mais répond aussi à une logique économique (procédures conformes à la réglementation des marchés publics).
- Dans le secteur libéral, l'activité des sages femmes est réalisée au sein d'un réseau de professionnels (anatomo-cytopathologistes et biologistes) et le choix du matériel dépendra de la pratique propre au réseau.

En règle générale, la pratique serait l'utilisation de la spatule d'Ayre pour les frottis conventionnels et l'utilisation de la cytobrosse pour les FCU en milieu liquide. La troisième option qui est l'association de la spatule d'Ayre à une brosse ou à un porte-coton ne semble pas être répandue dans la pratique.

Concernant l'acheminement des prélèvements vers la structure d'anatomo-cytopathologie ou de biologie médicale, le circuit est différent en fonction de la structure concernée.

Dans un établissement de santé, l'acheminement est réalisé souvent entre services du même établissement. Proximité qui pourrait, le cas échéant, favoriser un recueil d'informations complémentaires. La « pérennité » du personnel contribue également à une certaine continuité dans le parcours du prélèvement. Par ailleurs, la démarche d'assurance qualité mise en place au travers de la certification des services impose des règles de bonne pratique qui passent par une transmission d'information à tous les intervenants et un réajustement du comportement en temps réel (ex : en cas de changement de matériel ou de produits).

Pour le secteur libéral, les différents intervenants du réseau sont disséminés géographiquement ce qui nécessite un renseignement des fiches de transmission plus pointu d'autant que les circuits de transmission peuvent être variables :

1. la sage femme envoie le prélèvement à la structure d'anatomo-cytopathologie
2. la structure d'anatomo-cytopathologie récupère les prélèvements par un système de courriers
3. Il est demandé à la patiente de l'envoyer par la poste

² ART L4151-1 du code la santé publique 2009.

L'exercice de la profession de sage-femme peut comporter également la réalisation de consultations de contraception et de suivi gynécologique de prévention, sous réserve que la sage-femme adresse la femme à un médecin en cas de situation pathologique.

M^{me} Rivière rappelle par ailleurs la spécificité du FCU : c'est le seul examen pour lequel la sage femme est en lien direct avec la structure d'anatomocytologie. Pour tout autre prélèvement, elle s'adresse aux laboratoires de biologie médicale, il faut donc qu'elle s'assure que le circuit de transmission est bien maîtrisé.

Elle souligne, compte tenu de la mise en place progressive des consultations préventives de gynécologie au sein de la profession, que le niveau de respect des conditions de conservation et de transmission des prélèvements pourrait être dépendant du seuil d'activité de l'intervenant. Un seuil d'activité suffisant permettrait d'une part d'avoir une maîtrise technique du geste et aussi une organisation fonctionnelle optimale.

M^{me} Rivière rappelle à ce titre la nécessité de mettre en place des outils d'information, notamment *via* le collège national des sages femmes, pour rappeler les mesures concernant le circuit de recueil et de transmission des informations.

Elle rappelle aussi que le rôle de la sage femme est de suivre les femmes dans un contexte non pathologique et l'un des points sur lequel l'enseignement des sages femmes insiste est l'interprétation des résultats de la cytologie. Ainsi si le résultat de la cytologie est anormal, la sage femme a l'obligation d'adresser la patiente au gynécologue.

En résumé, les points clés à retenir de l'audition de M^{me} Rivière sont les suivants :

- l'importance pour les sages femmes d'avoir un niveau de pratique suffisant ;
- l'importance de maîtriser le circuit de transmission (bien remplir le bon, bien conserver le prélèvement, le donner à la bonne personne, de transmettre les informations cliniques et techniques avec le prélèvement) ;
- l'importance de comprendre le résultat de la cytologie ;
- l'importance de disposer de documents d'information pour aider à la diffusion des bonnes pratiques.

Compte rendu de l'audition de M. SEVESTRE 27 mai 2013

Dans un premier temps, M. Sevestre a rapporté l'expérience propre à son Service (CHU d'Amiens) où le frottis en phase liquide est réalisé depuis 1999, d'abord partiellement, puis totalement depuis environ une dizaine d'années. Plus de 6000 frottis sont réalisées par an et examinés au CHU d'Amiens. Ce qui en fait, à l'échelle nationale, pour un CHU, un centre assez important.

Le service d'anatomo-cytopathologie du CHU d'Amiens reçoit les frottis réalisés dans le service de gynécologie du même établissement et ceux d'hôpitaux environnants

La technique de cytologie en phase liquide adoptée par cette structure est la technique entièrement automatisée d'Hologic® avec le milieu ThinPrep®, elle est réalisée sans ouverture manuelle du flacon. Ce même flacon est utilisé le cas échéant pour le test HPV.

La réalisation du test HPV dans cette structure a débuté en 2000, d'abord dans le service d'anatomocytologie, puis l'activité a été reprise par le laboratoire de virologie en 2004.

Concernant les aspects organisationnels notamment le circuit d'acheminement des frottis, le service d'anatomo-cytopathologie fournit le matériel de prélèvement, (brosses type Cervex Brush® et tubes avec le milieu ThinPrep®) et la fiche de renseignements cliniques aux gynécologues. Si l'examen cytologique conclut à un diagnostic ASC-US, le matériel résiduel (résidu du milieu avec le prélèvement) est adressé à température ambiante au laboratoire de virologie, sans demande préalable au prescripteur.

M. Sevestre a précisé que la quasi-totalité des prélèvements arrivait dans du milieu ThinPrep®. Très peu d'échantillons (de l'ordre de 0,5 %) arrivent au service d'anatomo-cytopathologie dans un milieu autre que celui recommandé pour le système ThinPrep®. Les prélèvements sont alors traités par cyto-centrifugation.

Dans les rares cas où les frottis sont destinés uniquement à la détection de l'ADN d'HPV, le prélèvement est déposé par le gynécologue dans des tubes contenant du milieu spécifique à la virologie (Cervical Sampler®), fournis par le laboratoire de virologie. Ces tubes sont en principe envoyés directement au laboratoire de virologie, sans passage par le service d'anatomocytologie.

Concernant les erreurs susceptibles de survenir au niveau de la phase pré-analytique, M. Sevestre a relaté quelques incidents qui arrivaient parfois lors des changements de personnel (ex : arrivée d'internes). Certains plutôt habitués à utiliser la technique SurePath® laissent la brosse utilisée avec le milieu ThinPrep® dans le tube. Cette erreur qui nécessite l'ouverture du tube pour ôter la brosse avant son passage dans le système automatisé est source potentielle de contamination. M. Sevestre a souligné à ce propos la spécificité technique propre à chaque test et la nécessité de se conformer strictement aux instructions du fabricant.

Il a également rappelé l'importance de la traçabilité des échantillons qui passe par une transmission correcte des informations cliniques et techniques d'une étape à l'autre du processus d'acheminement des frottis.

Selon M. Sevestre l'étape la plus cruciale de la phase pré-analytique, est l'identification correcte de la patiente avec une concordance entre l'échantillon prélevé et l'identité de la patiente. Cette concordance passe obligatoirement par un étiquetage correct des tubes transmis aux structures effectrices.

Une bonne coordination entre les différents intervenants est également à prérequis à la réalisation optimale de la phase préanalytique. Au CHU d'Amiens, cette coordination est passée par un accord a priori entre les anatomopathologistes et les virologues sur le choix d'un milieu compatible avec la cytologie et le test HPV, par une information sur les conditions optimales de conservation

(température et durée) et par un accord sur le traitement des FCU hémorragiques par l'acide acétique, qui a priori, ne pose pas de problème pour leur technique de détection d'HPV.

Dans un deuxième temps, M. Sevestre a fourni les différents éléments de réponse au questionnaire qui lui avait été adressé au préalable, il considère que :

- Avant la réalisation du frottis, il est nécessaire de s'assurer de l'existence de conditions optimales³ chez les patientes.
- Le frottis, doit être réalisé sous contrôle visuel (spéculum), le site de prélèvement optimal étant le col utérin.
- l'impact de la nature du matériel de prélèvement sur la sensibilité de détection d'HPV, peut être très important. Il faut éviter toutes adhérences au matériel de prélèvement.
- Les dispositifs en coton et les spatules en bois sont donc à exclure. Le matériel à privilégier est la brosse souple qui doit toutefois être celle préconisée par le fabricant du milieu de transport.
- le choix du milieu de transport, doit se faire en concertation avec la structure effectrice : structure d'anatomo-cytopathologie ou laboratoire de virologie. Le prélèvement doit être recueilli dans le milieu de transport préconisé par la structure effectrice.
- La durée de conservation d'un prélèvement est définie par les fournisseurs des trousse de détection ; cette durée de conservation peut aller de quelques jours à quelques semaines.
- l'impact d'un défaut de libération optimal des acides nucléiques sur la sensibilité de détection d'HPV peut être important, cette étape doit être réalisée conformément aux recommandations du fabricant.

En conclusion

M. Sevestre considère qu'il est important de respecter :

- une identification correcte des tubes ;
- une bonne traçabilité des prélèvements ;
- strictement les instructions du fabricant du test pour la réalisation de la phase préanalytique ;
- une bonne structuration de l'ensemble du circuit avec un accord préalable entre les trois partenaires (gynécologues, anatomocytologistes et virologues).

³ ANAES 2002 :

- le frottis devrait être effectué à distance des rapports sexuels (48 heures), en dehors des périodes menstruelles, de toute thérapeutique locale ou d'infection et si nécessaire après traitement oestrogénique chez la femme ménopausée ;
- il est important d'expliquer à la patiente le but de l'examen et la technique, et de la rassurer ;
- il faut éviter de faire le toucher vaginal avant le frottis et d'utiliser un lubrifiant ;
- avant de faire le frottis, le col doit être correctement exposé à l'aide d'un spéculum ;
- le prélèvement doit concerner la totalité de l'orifice cervical externe et l'endocol.

Compte rendu de l'audition de M. TAAR 27 mai 2013

En préambule, M. Taar a présenté l'expérience propre à son laboratoire qui a commencé à réaliser le test HPV sur frottis en phase liquide et sur échantillon direct depuis environ une dizaine d'années. Ceci était en lien avec l'activité principale du laboratoire consacrée à la santé de la femme. A sa connaissance peu de LBM privés réalisent le test HPV. Environ 200 tests HPV sont réalisés par semaine dans le laboratoire.

Ce laboratoire reçoit les prélèvements de plusieurs structures d'anatomocytologie mais également en provenance directe de certains gynécologues. Le travail en réseau avec ces différents intervenants a inévitablement élargi le panel des pratiques auxquelles est confronté le laboratoire qui reçoit un minimum de cinq milieux de transport différents : ThinPrep®, SurePath®, EasyFix®, CytoScreen®, Novaprep® et Qualicyt®.

Le fait de recevoir ces 5 différents milieux selon M. Taar complique la gestion des prélèvements dans la mesure où des protocoles de conversion, validés par les fabricants des tests, doivent être réalisés. Ils introduisent des étapes supplémentaires (centrifugation, prélavage...) nécessaires à l'adaptation aux tests de détection utilisés par le laboratoire.

Selon M. Taar, l'utilisation « d'un milieu universel » faciliterait les pratiques, le rajout d'étapes supplémentaires est consommateur de temps d'une part et d'autre part source potentielle d'erreurs.

M. Taar rapporte par ailleurs que depuis l'arrivée de la cytologie en phase liquide avec des techniques automatisées, le recours aux liquides « maison » est de moins en moins constaté. Des discussions avec les structures d'ACP pourvoyant les prélèvements, ont permis d'obtenir une bonne coordination entre les deux acteurs : tous les prélèvements arrivent maintenant dans des milieux conformes aux tests utilisés dans le labo.

Pour ce qui est des techniques de recherche d'HPV, utilisées par le laboratoire, M. Taar cite la technique d'hybridation (hybride capture 2) et la technique de génotypage Papillocheck avec laquelle est utilisé exclusivement le milieu Qualicyt®. Ainsi, les tubes avec le milieu Qualicyt® sont distribués uniquement aux gynécologues qui font une demande spécifique de génotypage.

Concernant les conditions de conservation (durée et température) du FCU, elles doivent être conformes aux instructions du fabricant du test HPV. Le test HC2 notamment, requiert une conservation maximale de 21 jours à température ambiante.

Cette contrainte est en général respectée même si le délai de transmission entre le cabinet de gynécologie et la structure d'anatomo-cytopathologie reste par ailleurs lié aux différents circuits de transmission. En effet, selon que le prélèvement est envoyé par la poste, déposé par la patiente ou récupéré par un coursier (dont la fréquence de passage dépend du niveau d'activité du cabinet de gynécologie et d'anatomopathologie), le délai est variable.

A ce propos, M. TAAR a souligné l'importance de la fiche de transmission des informations qui doit notamment préciser la date de prélèvement conformément aux règles de bonnes pratiques des laboratoires de biologie médicale. Cette fiche de transmission est d'autant plus importante que la particularité du test HPV est que le prélèvement n'est pas réalisé dans le laboratoire de biologie et donc que les conditions préanalytiques ne sont pas maîtrisées par le biologiste. Cette fiche doit contenir à la fois des renseignements techniques et cliniques (ainsi qu'administratifs). Le laboratoire de M. TAAR a élaboré une fiche de transmission qu'il remet aux ACP et aux gynécologues afin qu'il puisse disposer toujours des mêmes renseignements concernant le prélèvement.

Sur les facteurs pouvant impacter le résultat du test de détection des tests HPV, M. Taar a souligné l'importance de la cellularité des prélèvements. Il considère que le manque de cellularité des prélèvements est l'un des principaux écueils de la phase pré-analytique. Le manque de standardisation au niveau du geste de prélèvement conduit invariablement à des prélèvements à cellularité

plus ou moins importante en fonction des opérateurs. Les problèmes pouvant être engendrés par l'utilisation de milieux non validés ne sont pas tant une dégradation de l'ADN (qui est une molécule résistante) que la présence de produits inhibant la réaction de PCR.

L'indication du génotype doit être précisé de façon plus nette (1^{ère} ou 2^{ème} intention) en fonction des nouvelles indications (cf. feuille de transmission aux anapath.).

Enfin, interrogé sur ce qu'il considère comme étant les points cruciaux qui permettent d'améliorer, la phase préanalytique M. Taar a évoqué :

- Une standardisation des protocoles de prélèvement afin de garantir une cellularité suffisante.
- Une identification appropriée du prélèvement (avec le nom de la patiente sur les flacons et pas uniquement un code attribué par la structure d'anatomocytopathologie).
- Une transmission rigoureuse des informations entre les différentes étapes d'acheminement du prélèvement via un formulaire sur laquelle sont reportés les renseignements : administratifs, cliniques (statut vaccinal, indications, site de prélèvement, diagnostic cytologique....), techniques (milieu dans lequel est transmis le prélèvement...).

Pour une coordination optimale, M. TAAR rajoute que les fiches doivent avoir été élaborées en commun avec les biologistes et les anatomocytopathologistes, de même que le milieu de transport doit être compatible avec la cytologie et la virologie et avoir été défini en concertation entre ces deux effecteurs de la chaîne préanalytique.

Compte rendu de l'audition de M^{me} HEARD 28 mai 2013

Les conditions optimales pour la réalisation et le transport d'un FCU en milieu liquide doivent être respectées notamment :

- Eviter le prélèvement pendant la période des règles.
- Eviter l'utilisation de lubrifiants avec le spéculum.
- Utiliser les œstrogènes (4 à 5 jours avant) chez les femmes ménopausées pour faciliter le prélèvement au niveau de l'endocol.
- Le matériel utilisé pour le prélèvement ne doit pas faire saigner.
- Le col doit être correctement visualisé et le prélèvement doit être réalisé au niveau de la zone de jonction de l'exocol et de l'endocol en opérant une rotation de 360 ° (2 ou 3 tours) avec la cyto-brosse.
- Le contenu doit ensuite être déchargé, conformément aux instructions du fabricant dans le flacon prévu à cet effet.
- Un bon étiquetage du prélèvement.
- Des conditions de transport respectant les préconisations du fabricant du test de détection en matière de délai et de température.
- Un flacon bien fermé et un emballage adéquat respectant l'intégrité du prélèvement et la sécurité des personnes.

L'étape pré-analytique, fait appel à 3 intervenants : le clinicien qui réalise le FCU, l'anatomo-cytopathologiste qui réalise la cytologie et le biologiste médical ou l'anatomo-cytopathologiste qui réalise la détection du test HPV en cas de frottis de type ASC-US.

Sur l'étape pré-analytique, M^{me} Heard a apporté les différents éléments de réponse au questionnaire qui lui avait été adressé au préalable.

Dans les frottis ASC-US hémorragiques, si un test HPV est réalisé, il est important de prévenir le virologue d'un éventuel prétraitement du prélèvement au laboratoire d'ACP par acide acétique

A propos des liquides de transport des prélèvements, M^{me} Heard rappelle :

- qu'il faudrait éviter les composants utiles pour la cytologie mais délétères pour la détection HPV ;
- que si le prélèvement est destiné à la cytologie et au test HPV, seuls les milieux validés par les fabricants pour ces deux analyses doivent être utilisés.

Les conditions optimales de conservation (durée maximale et température) des prélèvements dans le milieu doivent être celles qui sont spécifiées par le fabricant du milieu et du test HPV.

Une cellularité suffisante du prélèvement est un élément important à prendre en compte pour obtenir une phase pré-analytique de qualité, aussi bien pour la cytologie que pour la recherche d'HPV. Ainsi, M^{me} HEARD rappelle que les Recommandations anglaises préconisent un seuil de $10^4 - 10^5$ cellules pour la cytologie ; ce seuil pourrait convenir pour la recherche d'HPV mais à sa connaissance il n'y a pas de Recommandations officielles.

Concernant la libération des acides nucléiques, toutes les méthodes commercialement disponibles sont selon M^{me} Heard adéquates. Elles nécessitent en revanche un volume minimal de l'échantillon, de l'ordre de 50 à 100 µl.

Par ailleurs, dans l'objectif d'informer les différents utilisateurs des tests HPV sur la compatibilité entre les différents tests de détection de l'HPV et les différents milieux de conservation dans lequel le FCU est déchargé, le CNR a recueilli dans un tableau l'ensemble des informations retrouvées sur les notices des fabricants des trousse de détection et de génotypage présents sur le marché

français en 2013 et établi une correspondance avec les milieux de transport qui étaient validés avec les trousse.

Pour relayer cette mission d'information, un contrôle national de qualité (CNQ) est prévu courant 2014, il s'adressera aussi bien aux laboratoires de virologie qu'aux services d'anatomo-cytopathologie réalisant les tests HPV.

En conclusion

M^{me} Heard insiste sur la nécessité de rappeler les principes de base suivants :

- l'identification et l'étiquetage des prélèvements ;
- un emballage approprié à la nature et à la composition du milieu de transport ;
- la traçabilité du frottis avec la transmission d'une fiche comprenant les informations sur les gestes techniques et les éventuels prétraitements réalisés sur les échantillons depuis le prélèvement jusqu'à l'arrivée au laboratoire qui réalise la détection de l'HPV ;
- le recueil et la transmission des informations suivantes : la date de prélèvement, les renseignements administratifs, cliniques avec notamment le statut vaccinal HPV ;
- pour la réalisation des frottis, éviter les facteurs physiques ou chimiques susceptibles d'altérer la qualité du prélèvement ;
- pour le rendu des résultats, outre la spécification du test, de son seuil de détection, il est important de spécifier la structure qui a réalisé le test.

Elle insiste également sur la mise en place de procédures d'assurance qualité intra-laboratoire et inter-laboratoire pour l'examen de virologie.

Par ailleurs, M^{me} HEARD rappelle que les tests HPV « historiques » pour lesquelles la performance clinique a été évaluée et sur lesquelles reposent les recommandations actuelles ont des seuils compris entre 500 et 5000 copies/ml et délivrent un seul message : présence ou absence d'HPV oncogènes. Par contre, pour les tests de génotypage qui peuvent détecter jusqu'à 20-30 copies/ml d'HPV, la pertinence clinique d'un si faible seuil n'a pas été démontrée, leur utilisation pour le triage des ASC-US n'a pas été validée et aucune recommandation existante ne peut servir d'appui à l'interprétation de la présence de certains génotypes. Ces tests ont néanmoins un intérêt dans la recherche sur l'écologie du virus et dans la surveillance post vaccinale. Selon M^{me} Heard, les tests mixtes (avec un seuil de 300 copies/ml environ) sont les plus informatifs, ils concluent, conformément aux recommandations, à la présence ou l'absence d'HPV oncogènes et identifient le cas échéant les génotypes 16 et/ou 18. C'est cette multiplicité dans les tests utilisés en pratique avec des seuils différents de détection et des résultats de nature différente, spécificité a priori française, qui serait à l'origine de problème d'interprétation du résultat de ce test.

**Audition de M^{me} AILLET
29 mai 2013**

M^{me} Aillet a présenté l'organisation et la pratique de la structure d'anatomocytopathologie dans laquelle elle exerce, qui regroupe huit médecins anatomocytopathologistes

La technique de cytologie en phase liquide a été adoptée par cette structure à partir de 2011 qui a opté pour la technique Hologic® et le milieu ThinPrep®. Cette technique dont la procédure est entièrement automatisée présente, selon M^{me} Aillet, en plus de l'excellente qualité des images, l'avantage d'une pré-lecture informatisée qui identifie les zones suspectes et facilite ainsi l'approche analytique aux deux relecteurs consécutifs que sont respectivement le cytotechnicien et l'anatomocytopathologiste. Un contrôle qualité externe est par ailleurs réalisé par le fabricant tous les 6 mois.

Le test HPV quant à lui a été introduit à partir de 2012, le choix d'une technique automatisée, qui intègre la phase d'extraction, a également été adopté pour ce test. La technique de détection utilisée est l'amplification génique par PCR en temps réel de Roche (cobas® 4800 HPV test) homologué pour le milieu ThinPrep®.

M^{me} Aillet souligne à ce propos l'intérêt du frottis en phase liquide qui permet de réaliser la cytologie et le test HPV sur le même échantillon.

Le choix pour cette structure de disposer des deux techniques automatisées, visait à simplifier les aspects logistiques et par ailleurs la réduction des risques d'erreurs et de contaminations. A l'arrivée le tube réceptionné est identifié par un code barre, il parcourt l'étape cytologique et si le frottis est identifié ASC-US, le même tube sera utilisé pour l'analyse virologique sans jamais avoir été ouvert manuellement.

Néanmoins, le test HPV n'en est pas pour autant réalisé de façon systématique en cas de frottis ASC-US. Le déclenchement de l'analyse virologique dépendra de la pratique propre à chaque gynécologue. Pour certains, conformément à leur demande le test HPV est réalisé systématiquement. Pour d'autres, il leur est rappelé lors de l'envoi des résultats de la cytologie que les prélèvements sont conservés pendant 6 semaines dans l'éventualité où le prescripteur souhaiterait opter pour la recherche d'HPV.

Pour l'année 2012, environ 40 000 analyses cytologiques sur frottis en phase liquide ont été réalisés dans cette structure dont environ 1850 étaient ASC-US et sur lesquels 50 % sont HPV positifs.

La cytologie sur frottis conventionnel représente par ailleurs 60 % du volume total (60 000). En cas de frottis conventionnel qui se révèle ASC-US, et après accord du prescripteur, la patiente est prélevée à nouveau et le produit cellulaire du frottis, dans cette situation, est directement recueilli dans un flacon avec du milieu compatible avec la technique de détection d'HPV, Cobas®.

La structure, travaille en réseau avec plusieurs gynécologues, le choix de l'une ou l'autre des techniques de frottis est liée aux pratiques de chacun des prescripteurs.

Le matériel pour le recueil des FCU mis à leur disposition des prescripteurs par le cabinet d'ACP est adapté à leurs pratiques :

- frottis en phase liquide : brosses et tubes avec le milieu ThinPrep® pour la cytologie et éventuellement pour la recherche d'HPV ;
- frottis conventionnel : lame pour la cytologie et le tube spécifique pour une recherche éventuelle d'HPV.

Le cabinet met aussi à disposition des cliniciens la fiche de transmission (voir infra pour les renseignements demandés) et l'enveloppe de transmission.

Concernant l'acheminement des prélèvements, la structure a opté pour la mise en place d'un système de coursiers qui permet de récupérer les prélèvements dans un délai régulier, le transport se faisant à température ambiante.

Grâce à la mise en place de toute cette logistique (fourniture du matériel pour prélever et décharger, un feuillet avec les instructions du fabricant décrivant la technique de prélèvement, le bon de transmission et l'enveloppe pour l'emballage, le ramassage des prélèvements par un coursier) le cabinet maîtrise les étapes préanalytiques de la cytologie et de la recherche du test HPV et quasiment tous les prélèvements arrivent dans les conditions adéquates.

Ainsi, dans le contexte particulier de l'organisation de cette structure, les étapes qui semblent les plus fondamentales à M^{me} Aillet sont : l'acheminement, le déballage et l'identification de la patiente. M^{me} Aillet décrit que dans un premier temps est vérifiée l'intégrité de l'échantillon, ensuite que le nom de la patiente est bien apposé sur le flacon par la personne qui a réalisé le frottis et ensuite que celui-ci est bien en adéquation avec le nom qui figure sur la fiche de transmission. Un code barre est ensuite attribué à chaque patiente et une étiquette portant ce code est collée sur le tube.

M^{me} Aillet nous a transmis un modèle de la fiche de transmission utilisée par sa structure, sur laquelle figure la demande des éléments suivants :

- Identification du prescripteur.
- Renseignements administratifs (nom et prénom de la patiente, adresse, n° de sécurité sociale).
- Nature du prélèvement (frottis conventionnel, phase liquide, biopsie...).
- Localisation du prélèvement : col, endomètre, autre...
- Renseignements cliniques : date des dernières règles, aménorrhée, grossesse, etc.
- Antécédents : HPV, vaccin HPV.

Concernant les conditions optimales de réalisation du frottis, telles que définies par les recommandations, M^{me} Aillet pense que le respect des préconisations est certes important mais dans la pratique, il est tributaire de la structure de soins et par ailleurs de la population drainée par cette structure.

M^{me} Aillet, rapporte à titre d'exemple les contraintes propres aux gynécologues du CHU qui devant une population souvent issue de milieux défavorisés sans suivi gynécologique régulier, vont privilégier la réalisation d'un frottis, même si les conditions optimales ne sont pas réunies et ce afin de prévenir ou d'identifier d'éventuelles lésions.

A propos des tests à faible seuil de détection (moins de 50 copies/ml) M^{me} Aillet considère que ces derniers peuvent délivrer des messages non interprétables sur le plan clinique et rappelle que les recommandations de l'ANAES de 2002 étaient basés sur le test Hybride capture® de Qiagen, préconisant un rendu des résultats HPV HR positif ou négatif sans spécifications des génotypes. Ces recommandations reposaient par ailleurs sur des études de validation clinique réalisées avec des tests dont les seuils de détection sont compris entre 500 et 5000 copies/ml.

Pour le rendu des résultats, M^{me} Aillet nous a transmis un modèle de compte-rendu de détection d'HPV sur lequel sont renseignés : la technique d'HPV utilisée, les souches virales testées et la présence du contrôle interne. En cas de test HPV positif, il est précisé s'il s'agit d'HPV HR ou plus spécifiquement d'HPV 16 et/ou 18.

Au décours de cette audition qui concernait en priorité les conditions pré-analytiques, le problème de transmission des résultats du test HPV à la patiente conformément à la réglementation applicable aux laboratoires de biologie médicale, a néanmoins été soulevé. Cette question pose, problème dans la mesure où les résultats qui sont reçus par la patiente parfois avant même que le gynécologue n'ait pu les consulter représente une source potentielle d'anxiété et d'angoisse pour une patiente qui ne saura pas interpréter les résultats à la lumière de tout le contexte clinique.

En conclusion

Interrogé sur ce qui lui semblait les points fondamentaux à respecter pour la phase préanalytique du test HPV M^{me} Aillet a évoqué en priorité la qualité du prélèvement qui doit :

- Etre réalisé au niveau du bon site, c'est-à-dire la zone de jonction entre l'endocol et de l'exocol.
- Contenir un nombre de cellules suffisant.
- Etre déchargé dans un liquide de conservation validé par le fabricant du test HPV si le prélèvement sert uniquement pour ce test (après une cytologie conventionnelle) et également par le fabricant du test de cytologie si le prélèvement sert à la fois pour la cytologie et la recherche du virus (cytologie en phase liquide).
- Respecter les délais et température de conservation indiqués par le fabricant du test HPV.

M^{me} Aillet a insisté par ailleurs sur l'identification et la traçabilité des prélèvements et rappelé que les erreurs les plus courantes sont souvent les plus grossières (ex : manque d'identification du praticien et de la patiente).

Un des points essentiels également pour M^{me} Aillet est la maîtrise de la chaîne des intervenants qui permet au prélèvement d'arriver dans de bonnes conditions.

M^{me} Aillet a de plus rappelé, l'intérêt de respecter les bonnes pratiques respectant les règles préconisées par les fournisseurs de matériel validés FDA et CE pour réaliser ces actes de biologie moléculaire afin d'assurer une démarche pré-analytique et analytique optimale.

Les démarches qualité des bonnes pratiques sont actuellement volontaires dans le cadre par exemple de l'AFAQAP, il n'existe en effet pas encore de cadre officiel défini, contrairement aux laboratoires de Biologie. La norme NF EN ISO 15189 ne peut être appliquée in extenso pour l'exercice de l'anatomie pathologique.

Lors de la validation du présent compte rendu d'audition par M^{me} Aillet, elle a rajouté qu'un groupe d'étude allait prochainement être mandaté par l'AFAQAP et le CNPATH pour déterminer avec la DGS quelle structure normative sera la plus adaptée à la profession.

Compte rendu de l'audition de M^{me} CLAVEL-CRAVOISIER 29 mai 2013

En introduction, M^{me} Clavel souligné l'intérêt du sujet, elle estime que le rappel des choses les plus simples lors de la réalisation de la phase pré-analytique du test HPV (choix de la brosse pour réaliser le frottis et du milieu de prélèvement) est primordial pour l'obtention d'un résultat analytique optimal.

Elle confirme, par ailleurs, que la littérature sur le sujet n'est pas très abondante. A sa connaissance il n'existerait pas beaucoup d'études qui s'intéressent à la phase préanalytique. Elle a cité néanmoins les recommandations néerlandaises publiées par Chris Meijer⁴ *et al* qui définissent lignes directrices générales de laboratoire pour les tests HPV.

M^{me} Clavel, a présenté la structure dans laquelle elle exerce. Il s'agit d'un laboratoire hospitalier de Pathologie : « Histologie, Cytologie et Biologie Cellulaire » (laboratoire Pol Bouin) du Pôle de Biologie du CHU de Reims, réalisant environ 20 000 examens cytologiques, 13 000 examens histologiques et 5000 tests HPV annuellement. Cette structure travaille depuis 1997 sur le dépistage du cancer du col de l'utérus et depuis 1999, sont effectués conjointement la cytologie en milieu liquide (avec le milieu ThinPrep®) et le test HPV (papillomavirus humains, détectés par le test Hybrid Capture 2®, Qiagen/Digene).

1. Cytologie

1.1. Réalisation du frottis

Le type de brosse utilisée pour faire un frottis est important : forme en trident type Cervex Brush® ou encore forme en cône, afin de bien frotter la jonction endocol-exocol (cible des HPV) et entrer dans le canal endocervical. Les écouvillons cotonnés sont à proscrire, beaucoup de cellules restent collées sur le coton. La spatule d'Ayre est plutôt réservée pour les cols sténosés.

1.2. Examen cytologique

Après la réalisation du frottis, les cellules sont soit étalées sur une lame, fixées et colorées (cytologie conventionnelle), soit recueillies dans un milieu liquide pour la cytologie puis filtrées, apposées et colorées (cytologie en milieu ou phase liquide). La sensibilité de ces 2 types de cytologie à détecter des lésions cervicales de haut grade est proche, avec un avantage pour la cytologie en milieu liquide. La majorité des pathologistes reconnaît la qualité et la facilité de lecture des lames en cytologie liquide, avec l'avantage majeur de pouvoir réaliser plusieurs examens (cytologie, HPV reflex par exemple) sur le même prélèvement, sans reconvoquer la patiente.

Nous avons malheureusement en France plus de 17 milieux liquides différents pour la cytologie, présentant des coûts différents. Tous ces milieux prévus au départ pour la cytologie ne sont pas toujours clairement validés pour la biologie moléculaire, notamment pour la recherche d'HPV, ce qui est problématique. Il faut encore distinguer les milieux pour la conservation de l'ADN et/ou de l'ARN d'HPV. En pratique, les industriels devraient maintenant préciser si le milieu fourni est compatible avec des examens de biologie moléculaire ; citons les deux milieux validés et les plus cités dans la littérature : ThinPrep® / Hologic et SurePath® / Becton Dickinson.

⁴ Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older.

Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Int J Cancer. 2009 Feb 1;124(3):516-20.

Concernant les facteurs chimiques susceptibles d'altérer la détection d'HPV, M^{me} Clavel cite :

- le liquide de Bouin (pour l'Histologie) qui abime les acides nucléiques (n'est quasiment plus utilisé) ;
- le formol également connu pour être délétère pour le test Hybride Capture 2[®] car il inhibe le processus de chimioluminescence sur lequel repose ce test (ne devrait pas être utilisé pour la cytologie) ;
- des inhibiteurs de PCR divers, enzymatiques ou non, à connaître dans les milieux liquides ;
- enfin, concernant le traitement des prélèvements hémorragiques par l'acide acétique dans les conditions habituelles d'utilisation c'est-à-dire d'acide acétique dilué dans le milieu, il n'a pas été observé d'impact sur la détection des HPV.

En pratique, il faut respecter les consignes de l'industriel. Gynécologues, pathologistes et biologistes doivent s'informer et définir un milieu à utiliser systématiquement dans leur pratique du dépistage du cancer du col utérin. A Reims, au CHU, nous utilisons donc depuis 1999 le milieu liquide-ThinPrep[®]. Au départ, la brosette doit être tournée plusieurs fois au niveau de la jonction du col et déchargée vigoureusement dans le milieu liquide Thinprep[®], en frottant plusieurs fois la brosette contre la paroi du pot, afin de bien décharger les cellules de la brosette. La brosette bien rincée est ensuite jetée. Précisons que pour d'autres milieux liquides, la brosette doit être laissée dans le milieu liquide (confusion pour beaucoup de médecins préleveurs). Les conditions de stockage des pots de milieux liquides sont variables (2 à 4 semaines environ, plutôt à température ambiante).

Il existe des automates dédiés pour la préparation des lames de cytologie à partir du milieu Thin-Prep[®] par exemple. Un aliquot du milieu liquide est aspiré et filtré. Le filtre est ensuite apposé sur une lame, les cellules déposées sont ensuite colorées selon le protocole classique de cytologie (« Pap smear »). M^{me} Clavel considère que depuis le passage à la cytologie en phase liquide, un progrès indéniable a été constaté notamment sur la qualité et la facilité de lecture des lames en cytologie.

Enfin, il existe d'autre part, des appareils de lecture automatisée de ces lames de cytologie, le robot opérant un tri sélectif des noyaux anormaux et par cette présélection facilite en amont le travail de l'anatomocytologiste. Ces appareils ne sont pas encore très répandus pour des raisons de coûts principalement.

2. Test ADN HPV

Il existe quelques test HPV « FDA approved » mais Hybrid Capture 2[®] reste actuellement la technique de référence mondialement. Pour rappel, le test HPV en France n'est remboursé qu'en cas de frottis atypique identifié comme ASC-US, il est alors possible de confronter directement le résultat de la cytologie au résultat du test HPV.

En pratique, il existe de nombreux tests et techniques pour rechercher des HPV (ADN ou ARN) par biologie moléculaire. Les techniques sont plus ou moins automatisables (hybridation en phase liquide, PCR, PCR en temps réel, système Luminex, séquençage, système TMA ou NASBA pour l'ARN HPV). Il existe des tests HPV cocktails (détection d'une douzaine d'HPV simultanément sans connaissance de chacun des types HPV) ou des tests de du génotypage précis de type HPV. Ces tests HPV présentent des seuils de sensibilité différents (pour la détection de lésions de haut grade), les tests par PCR étant par exemple plus sensibles que ceux par hybridation en phase liquide ; mais il convient alors de distinguer les tests avec des seuils de détection analytiques (sans validation clinique) des tests avec des seuils de détection clinique. Rappelons en effet que l'HPV n'est pas un marqueur tumoral. La présence d'HPV traduit au départ la présence d'une infection, plus ou moins ancienne, éliminée dans 80 à 90 % des cas, seules les infections persistantes à HPV étant à risque de développement de lésions cervicales de haut grade. La prévalence HPV en France, tout âge confondu est d'environ 10 %. Le but est de distinguer une infection à HPV qui persistera avec un risque de lésion, de celle qui régressera, mais le marqueur parfait

n'existe pas actuellement. D'autres paramètres HPV tels la charge virale, l'intégration virale etc , ne sont pas utilisables en routine actuellement. La tendance est au développement de nombreux tests de génotypage (avec automatisation possible), afin d'identifier en particulier les HPV les plus à risque de types 16 et 18, chez les femmes vaccinées ou non.

Ainsi, la technique de détection d'HPV utilisée dans la structure où travaille M^{me} Clavel, est Hybrid Capture2[®] (test cocktail pour 13 HPV à haut risque, en hybridation en phase liquide). Ce test est la référence mondiale actuellement et comporte des étapes de dénaturation de l'ADN, d'hybridation (avec des sondes ARN) et de détection par chimioluminescence, sur des microplaques. Ceci peut être réalisé manuellement ou via un robot (Rapid Capture System, dédié à Hybrid Capture2[®]). L'analyse sur microplaques nécessite des techniciens entraînés à ce type de technique et l'utilisation de robot assure un gain de temps, un haut débit et une grande performance. M^{me} Clavel, rappelle que quelle que soit la technique de détection d'HPV, il est primordial de suivre les instructions du fabricant de la trousse.

Selon M^{me} Clavel, les tests, entre autres moléculaires, évoluent très vite et l'avenir est aux plates-formes de biologie moléculaire, mutualisant des moyens humains (en pathologie et biologie) et techniques (appareillages coûteux, de surcroît mutualisables le plus souvent pour l'analyse d'autres cibles que l'HPV). Ces appareils sont aujourd'hui de plus en plus performants, évoluent vite et comportent des logiciels plus complexes qu'auparavant, nécessitant parfois des ingénieurs et des bioinformaticiens spécialisés (exemple des nouveaux séquenceurs NGS² à moyen débit et haut débit qui vont changer la biologie et la génétique moléculaires dans les 5 ans à venir). Les coûts diminueront avec l'évolution des technologies et le regroupement des actes sur des plates-formes habilitées. Nous avons ainsi l'exemple remarquable des 28 plates-formes labellisées INCa (Institut national du Cancer) en France pour la génétique moléculaire des cancers.

D'une façon générale, la biologie moléculaire nécessite des règles de bonne pratique et de locaux très strictes. Laboratoires ou plates-formes doivent actuellement suivre la mise en place de la procédure d'accréditation, avec des normes de qualité et des procédures de travail. M^{me} Clavel souligne l'importance d'une concertation préalable entre l'anatomocytologiste et le biologiste correspondant pour que le milieu liquide de transport soit compatible avec la cytologie et le test de détection d'HPV. Il est aussi important de connaître les antécédents gynécologiques de la femme (avec des lésions de haut grade traitées par exemple) mais également maintenant son statut vaccinal (complet avec 3 injections ou non).

En conclusion, M^{me} Clavel, rappelle que d'une façon générale, il faudrait :

- de nouvelles recommandations sur la réalisation des frottis en milieu liquide et l'emploi des tests HPV en dépistage cervical ;
- bien respecter les principes de bonnes pratiques relatives au prélèvement et aux techniques de biologie moléculaire, suivre les instructions du fabricant ;
- respecter les spécificités liées à chaque test HPV, le choix de la technique HPV dépendant aussi du débit HPV du laboratoire concerné ;
- définir entre les pathologiste, biologiste et gynécologue, le type de résultat HPV souhaité (test cocktail, génotypage etc) avec la gestion du résultat et du suivi de la patiente en conséquence (bien vaccinée, mal vaccinée -1 seule dose- ou non vaccinée).

Compte rendu de l'audition de M. MERGUI

30 mai 2013

M. Mergui en sa qualité de gynécologue a été en particulier interrogé sur les éléments concernant la première étape de la chaîne pré-analytique, c'est-à-dire la réalisation du frottis cervico-utérin par un professionnel de santé.

Interrogé sur les conditions optimales de réalisation d'un frottis, M. Mergui confirme, conformément aux recommandations en vigueur, que le site de prélèvement optimal se situe au niveau de la zone de transformation.

M. Mergui insiste par ailleurs sur la visualisation du col avant la réalisation du prélèvement. Pour se faire, il préconise l'utilisation de spéculums adaptés à l'âge et à la morphologie locale de la patiente.

Sur le matériel de prélèvement, M. Mergui utilise dans sa pratique personnelle, du matériel en plastique, en particulier les cytobrosses et brosses de type Cervex Brush. A sa connaissance, c'est le cas aujourd'hui de la majorité des praticiens.

Tout le matériel nécessaire au prélèvement (brosses, tubes et enveloppes) lui est fourni par les structures d'anatomocytopathologie correspondantes.

M. Mergui qui travaille avec plusieurs structures d'anatomo-cytopathologie rappelle les spécificités propres aux différentes techniques (brosse et milieu de transport) et la nécessité de respecter les instructions de chaque fabricant pour ce qui concerne la modalité de déchargement du frottis dans le flacon prévu pour cet effet. Certaines méthodes préconisent de laisser la tête de la brosse dans le liquide d'autres uniquement de la décharger, une grande vigilance s'impose afin d'éviter toute confusion entre les deux techniques.

M. Mergui rappelle, par ailleurs, conformément aux recommandations européennes de 2007 et américaines de 2000 que l'utilisation de coton n'est pas recommandée pour le prélèvement (car c'est une matière absorbante) et confirme que l'utilisation simultanée de la brosse plastique mixte exo et endocol et/ou de la cytobrosse quand l'orifice est étroit offrent le meilleur résultat.

Néanmoins, il rappelle qu'aujourd'hui il existe des brosses adaptés qui peuvent remplir la même fonction (Cervex Brush®) et affranchissent de l'utilisation de deux dispositifs à la fois.

M. Mergui réalise tous ses frottis en phase liquide et en cas d'ASC-US demande que soit systématiquement réalisé le test HPV. Il considère que de disposer directement du résultat du test HPV est très informatif pour le clinicien, moins générateur de coût pour la collectivité le prélèvement sert à la fois à l'examen cytologique et le cas échéant au test HPV.

Par ailleurs, cette démarche est plus confortable et moins génératrice d'anxiété pour la patiente qui n'est pas convoquée pour un nouveau prélèvement.

Dans ce même esprit, M. Mergui demande à ses laboratoires correspondants de lui transmettre directement les résultats positifs de la cytologie et/ou du test HPV afin qu'il puisse les présenter à la patiente à la lumière de l'ensemble des autres éléments cliniques. Une transmission directe des résultats du test HPV à la patiente pouvant être génératrice d'anxiété inutile.

Concernant, la fiche de transmission à adresser aux structures d'anatomocytopathologie, M. Mergui renseigne tous les éléments cliniques qui sont à prendre en compte pour le résultat de la cytologie et/ou du test HPV (antécédents de lésion, grossesse, ...), Il y est également précisé s'il s'agit d'un dépistage primaire ou d'un suivi après récurrence.

Pour M. Mergui, les erreurs de la cytologie les plus souvent observées sont pour 50 % environ attribués à un défaut de prélèvement (nombre insuffisant de cellules ?). Le plus important dans cette étape pour assurer une bonne cytologie et une détection optimale d'HPV est :

- De recueillir un nombre suffisant de cellules de l'exocol et l'endocol.
- D'obtenir des prélèvements le moins hémorragiques possible.

Il rappelle par ailleurs, l'un des avantages des frottis en phase liquide qui est celui de la présence de composés hémolytiques dans le milieu de transport qui permettent d'améliorer la qualité de la suspension cellulaire et par ailleurs celle de l'examen cytologique et du test HPV.

M. Mergui considère par ailleurs qu'il est important que le milieu dans lequel est déchargé le FCU soit validé pour les techniques utilisées par la suite (cytologie et / ou test HPV). En tant que clinicien, il souhaiterait être informé de la manière dont la validation des milieux a été faite.

Pour la phase transport, celle-ci est assurée, à température ambiante, par les coursiers des laboratoires correspondants.

Concernant le rendu des résultats, étape qui concerne plus la phase post-analytique mais dont M. Mergui a tenu à rappeler l'importance. Il considère que les conclusions apportées par certains tests de génotypage de faible sensibilité, qui peuvent identifier des génotypes particuliers, délivrent des messages difficilement interprétables sur le plan clinique. Ils pourraient représenter une source d'anxiété pour les patientes, une source de traitements inutiles et par ailleurs de dépenses de santé non pertinentes.

Selon M. Mergui, il est plus important dans le contexte de cette infection de raisonner en 3 différents niveaux de risques de cancer du col :

- Risque très faible en absence d'HPV HR.
- Risque intermédiaire en présence d'HPV HR.
- Risque élevé en présence spécifiquement des HPV 16 et/ou 18.

Interrogé sur ce qu'il faudrait recommander en particulier lors de l'étape de prélèvement M. Mergui rappelle qu'il faut :

- Eviter toute sollicitation physico-chimique (lubrifiant, savon, colposcopie....) en amont de la réalisation du frottis.
- Veiller à compléter le plus possible la fiche de transmission avec les renseignements cliniques.
- Visualiser du col avec un spéculum de taille adaptée à la situation de la patiente avant réalisation du prélèvement.
- Utiliser un matériel en plastique.
- Brosser à l'intérieur et l'extérieur du col avec les brosses types Cervex Brush ou autres brosses.
- décharger immédiatement le prélèvement dans le milieu de transport validé avec le test de détection d'HPV.
- Ne pas oublier d'identifier correctement la patiente sur le flacon.

Compte rendu de l'audition de M^{me} BERGERON

30 mai 2013

M^{me} Bergeron, anatomocytologiste exerçant dans le laboratoire CERBA a parlé de son expérience personnelle à travailler dans une structure régie par la réglementation applicable aux laboratoires de biologie médicale.

Le laboratoire Cerba est rentré dans une démarche d'accréditation pour leur activité de biologie depuis 1999 et va entreprendre par ailleurs une démarche volontaire pour accréditer son activité de cytologie cervicale à partir de 2014.

M^{me} Bergeron a présenté l'expérience et l'organisation propre au laboratoire Cerba qui réalise aussi bien les examens cytologiques (dans le département de cytologie, sous la responsabilité d'un anatomocytologiste) que le test HPV (dans le département de virologie, sous la responsabilité d'un biologiste médical). Plus de 400 000 frottis sont examinés par an. Sur l'ensemble de ces frottis, 5 % sont des frottis conventionnels et 95 % des frottis en phase liquide. Le taux de frottis ASC-US retrouvé est de l'ordre de 3 % dont la moitié environ soit 1,5 % est HPV HR positif.

Le laboratoire Cerba reçoit les frottis soit directement du prescripteur (pour la cytologie et/ou pour le test HPV), soit en deuxième intention de la part des anatomo-cytologistes pour les frottis ASC-US pour lesquels le prescripteur a décidé de la réalisation d'un test HPV.

Le laboratoire Cerba met à disposition des prescripteurs des flacons avec du milieu ThinPrep®, validé pour la technique de cytologie et pour la technique de détection d'HPV qu'il utilise. Si le flacon est destiné uniquement à la virologie, il contient du milieu Abbott® avec le test Abbott⁵ utilisé actuellement par les laboratoires Cerba pour la détection d'HPV par PCR en temps réel.

Le département de virologie du Laboratoire Cerba reçoit des prélèvements de très nombreux correspondants. Quand il y a eu concertation préalable, le correspondant utilise le milieu de la technique utilisée par CERBA ou un milieu pour lequel CERBA a fait une étude de validation. Mais quand cet échange n'existe pas, et c'est plus souvent le cas avec les correspondants qui envoient ponctuellement des prélèvements, il peut y avoir des défauts de transmission d'information notamment : le milieu de transport, la date de prélèvement, l'identité de la patiente. M^{me} Bergeron rapporte qu'environ 6 % des prélèvements destinés à la recherche d'HPV n'ont pas d'identification du milieu de transport.

En conclusion, M^{me} BERGERON, rappelle qu'il est important que le milieu utilisé pour déposer le FCU soit un milieu compatible avec la technique de HPV utilisée par la suite, ou pour la technique de cytologie et la technique de détection de l'HPV.

Selon M^{me} Bergeron, un autre point primordial à respecter dans cette chaîne est la traçabilité du prélèvement. Cette traçabilité est assurée chez Cerba par la mise à disposition des prescripteurs d'une fiche qui répertorie tous les éléments à renseigner : date de prélèvement, renseignements administratifs, antécédents cliniques et statut de vaccination, etc. Ce bon permet aussi au clinicien d'indiquer s'il souhaite qu'une recherche d'HPV soit réalisée suite à une cytologie ASC-US. Dans ce cas, le laboratoire lui envoie en même temps le résultat des deux examens (cytologie et recherche d'HPV).

Concernant les conditions optimales de réalisation du frottis, telles que décrites dans les recommandations française et internationales relatives à la cytologie, M^{me} Bergeron estime qu'il est important de les respecter pour s'assurer d'un prélèvement optimal pour le test HPV notamment en évitant tout facteur physique ou chimique susceptible d'altérer la qualité du frottis.

⁵ the Abbott RealTime High Risk HPV PCR assay (Abbott PCR).

Sur le site de prélèvement, M^{me} Bergeron estime compte tenu de la répartition cartographique différentielle du virus (HPV oncogènes en majorité au niveau du col de l'utérus et HPV non oncogènes au niveau des organes génitaux externes) que le site de prélèvement optimal est l'orifice externe du col de l'utérus.

L'impact de la nature du matériel et de la technique de prélèvement sur la sensibilité de détection d'HPV, peut selon M^{me} Bergeron être important, c'est pour cette raison qu'il faut privilégier, les cytobrosses et les brosses de type Cervex Brush® préconisées par les fabricants des tests et exclure les dispositifs en coton et les écouvillons en plastique. Les milieux de conservation à utiliser sont ceux recommandés par les fournisseurs des tests HPV et si toutefois le laboratoire décide d'utiliser d'autres milieux, ceux-ci doivent faire l'objet d'études de validation.

Concernant les conditions de conservation du prélèvement, durée et température, elles doivent correspondre à celles qui sont définies par les fournisseurs des trousse de détection.

Par ailleurs, pour assurer une détection d'HPV optimale, le prélèvement doit selon M^{me} Bergeron contenir une cellularité suffisante (qui peut éventuellement être quantifiée par l'anatomocytologiste) et ne pas être déchargé dans un milieu contenant certains fixateurs utilisés pour l'examen cytologique (alcool, formol) délétères pour la libération des acides nucléiques et par ailleurs pour l'analyse virologique.

Interrogée sur l'étape qu'elle considérait comme la plus cruciale dans la chaîne pré-analytique, M^{me} Bergeron cite : le respect des délais.

En résumé, les points clés à retenir de l'audition de M^{me} Bergeron sont les suivants :

- Une identification correcte des tubes (concordance entre l'échantillon prélevé et l'identité de la patiente).
- Une bonne traçabilité des prélèvements avec impérativement la date de prélèvement et les conditions de conservation (délai et température).
- Vérifier la bonne cellularité du prélèvement.
- utiliser des milieux de transport conformément aux instructions du fabricant du test d'HPV ou le cas échéant produire des études de validation du milieu utilisé.
- Eviter l'utilisation des fixateurs (alcool ou formol) par interversion des tubes destinés à l'histologie et ceux destinés pour la cytologie.
- Toujours se conformer aux instructions du fabricant concernant la durée et la température de conservation du prélèvement avant réalisation du test HPV.

Compte rendu de l'audition de M. SCHMIT 30 mai 2013

M. Schmit est responsable d'un centre de prévention des maladies transmissibles (CPMT) faisant partie du CHU d'Amiens, centre polyvalent qui regroupe les activités des CDAG⁶, CIDDIST⁷, CLAT⁸ et centre de vaccinologie. Ce centre, de par son activité de dépistage est amené à titre préventif à réaliser des frottis chez les jeunes femmes qui s'y présentent dans un contexte d'infection sexuellement transmissible.

M. Schmit souligne l'intérêt d'une telle structure qui recouvre une notion globale de prévention : dépistage et vaccination. L'intérêt étant de récupérer les personnes qui arrivent pour le dépistage pour une vaccination.

Concernant le dépistage d'HPV, M. Schmit estime que le frottis en phase liquide présente l'avantage de permettre d'affiner la conduite à tenir devant un examen cytologique anormal sans avoir à faire revenir la patiente. D'autant que, devant les risques néoplasiques du virus HPV et devant l'infléchissement de l'adhésion à la vaccination anti HPV en France, il permet de multiplier les possibilités pour les femmes d'avoir et un examen cytologique et un test HPV à la fois.

Ainsi après concertation avec toutes les parties prenantes, il a été adopté par ce réseau (CPMT et CHU : Service d'anatomocytopathologie et Laboratoire de biologie médicale), exclusivement les frottis en phase liquide dans du milieu Thinprep®, compatible avec la cytologie et la virologie.

M. Schmit comprend par ailleurs la difficulté et les spécificités du test HPV du fait de :

- la multiplicité des intervenants ;
- la multiplicité des tests et des milieux de transport qui compliquent la standardisation des protocoles ;
- la complexité logistique pour l'anatomo-cytopathologiste qui doit garder ce prélèvement un certain temps avant que le gynécologue ne décide de la conduite à tenir en cas d'ASC-US ;
- la position en fin de chaîne des biologistes dont la rigueur est exemplaire et à qui on demande une fiabilité des résultats sur un prélèvement dont ils n'ont pas géré toute la phase préanalytique.

Toutes ces spécificités rendent indispensable selon M. Schmit une parfaite coordination entre les différents intervenants de la chaîne avec la nécessité que dans un tel réseau, soit demandé en priorité l'avis de l'effecteur en bout de chaîne.

Sur les aspects techniques et sur le circuit de transmission du prélèvement M. Schmit s'est renseigné auprès de ses collègues du CPMT et du CHU et a recueilli ainsi les différents éléments de réponse relatifs aux questions qui lui avaient été adressées au préalable.

Concernant les conditions optimales de réalisation d'un frottis, selon M. Schmit, il paraît évident dans un tel contexte que celles qui sont préconisées pour une bonne cytologie soient respectées pour la virologie dès lors que le prélèvement servira pour les deux étapes. Il faudra néanmoins être très vigilants sur les paramètres susceptibles de perturber l'analyse virologique notamment les inhibiteurs de PCR.

Il semble également établi aujourd'hui, selon M. Schmit, que le matériel de prélèvement soit en plastique ou en dacron.

Dans l'organisation qui est la leur, le premier maillon de la chaîne est le CPMT où trois médecins sont en charge de la réalisation des frottis. Ils veillent avant réalisation du frottis à ce que le col soit

⁶ Centre de dépistage anonyme et gratuit.

⁷ Centre d'Information de Dépistage et de Diagnostic des Infections Sexuellement Transmissibles.

⁸ Centre de lutte antituberculeuse.

bien visualisé et à ne pas utiliser de lubrifiant sur le spéculum. Les frottis sont ensuite prélevés au moyen d'une brosse au niveau de la zone de jonction de l'endocol et de l'exocol. La brosse est ensuite déchargée dans du milieu Thinprep® compatible avec la cytologie et la virologie. Les prélèvements sont transportés quotidiennement par navette au CHU.

Au niveau de la structure d'anatomo-cytopathologie, la suspension cellulaire est divisée en deux aliquotes dont l'un servira à la cytologie et l'autre à un test HPV éventuel. Les flacons avec le milieu de conservation sont conservés à température ambiante pendant une durée maximale de 72 h avant réalisation de l'examen cytologique. Arrivé au laboratoire de virologie, le prélèvement sera conservé à 4°C avant réalisation du test HPV.

Si le résultat de l'examen cytologique est ASC-US, le test HPV est réalisé d'emblée. M. Schmit insiste à ce propos sur la nécessité de clarté des commentaires rendus par le biologiste au clinicien à qui revient la décision clinique.

Au total, dans le contexte particulier de ce sujet, M Schmit insiste sur la notion de réseau et sur la nécessité de coordination et transmission d'informations entre les différents intervenants de la chaîne pré-analytique afin que le prélèvement qui arrive en fin de parcours chez le biologiste soit réceptionné dans les conditions les plus optimales possibles.

Compte rendu de l'audition de M^{me} PEIGUE-LAFEUILLE 31 mai 2013

En introduction, M^{me} Peigue-Lafeuille a tenu à rappeler que dans une démarche de biologie moléculaire, il convient de différencier 4 étapes :

- la phase préanalytique ;
- la phase analytique de réalisation du test ;
- l'interprétation du résultat ;
- la décision médicale.

M^{me} Peigue-Lafeuille, rappelle que chacune de ces étapes est importante mais souligne que la phase pré-analytique est de loin la plus cruciale car elle conditionne le résultat du test et en conséquence la décision médicale en aval.

Or très peu de travaux sont publiés sur la phase préanalytique, qui selon M^{me} Peigue-Lafeuille, malgré son importance ne suscite pas beaucoup d'engouement chez les professionnels de santé plus enclins à publier sur l'efficacité des techniques. M^{me} Peigue Lafeuille a néanmoins cité les référentiels de la société française de microbiologie publiés en 2010⁹ et un ouvrage portant sur le diagnostic moléculaire des maladies infectieuses¹⁰.

Un travail sur les conditions pré-analytiques du test de détection de l'HPV est d'autant plus important que le prélèvement (le FCU) d'une part n'a pas lieu au laboratoire de biologie médicale et d'autre part peut être réalisé par plusieurs professionnels (gynécologues, médecins généralistes, sages-femmes, etc.).

M^{me} Peigue-Lafeuille a ensuite présenté la méthode de détection utilisée depuis fin 2012 au laboratoire du CHU de Clermont-Ferrand dans lequel elle exerce. Il s'agit du test HPV Abbott Real time High Risk HPV qui détecte un cocktail de 12 HPV HR et réalise le génotypage des HPV 16 et 18. Elle a tenu à préciser qu'il s'agit de la technique retenue à ce jour au laboratoire de Virologie du CHU de Clermont et donc c'est cette technique qui est prise pour illustrer son propos. Elle ne fait pas une quelconque promotion de supériorité de cette trousse. Le fournisseur est susceptible de changer dans le temps.

Dans ce CHU, c'est la cytologie conventionnelle qui est utilisée. Ainsi, le prélèvement qui arrive au laboratoire de virologie est spécifique à la recherche d'HPV. Les tubes de prélèvement avec le milieu de transport adéquat sont fournis par le laboratoire de virologie aux gynécologues du CHU, ce qui permet de maîtriser les conditions pré-analytiques.

M^{me} Peigue-Lafeuille tient à souligner que bien en amont de toute réalisation d'acte technique, le bon étiquetage des tubes, en respectant la concordance entre l'identité de la patiente et son prélèvement, est un prérequis. Elle rappelle en ce sens les préconisations du GBEA.

Sur les facteurs susceptibles d'influencer la sensibilité de détection d'HPV, M^{me} Peigue-Lafeuille considère que tous ceux répertoriés dans le questionnaire préétabli¹¹ peuvent avoir un impact très important.

Concernant les conditions optimales de réalisation du frottis, telles que décrites dans les recommandations française et internationales relatives à la cytologie, M^{me} Peigue-Lafeuille considère qu'il faut « par principe » les respecter pour s'assurer d'un résultat optimal pour le test HPV notamment en évitant la présence d'hémoglobine, de traitements médicamenteux locaux ou de gel, qui sont des inhibiteurs potentiels de PCR.

⁹ Règles générales du REMIC 2010 4^{ème} édition.

¹⁰ Molecular Diagnostics of Infectious Diseases. Harald H. Kessler 2010.

¹¹ Cf. annexe questionnaire pour l'audition.

Le prélèvement doit être réalisé par un professionnel de santé (médecin, sage-femme) au niveau de la zone de jonction entre l'endocol et l'exocol. Seul un matériel souple (cytobrosse) doit être utilisé, les dispositifs en bois ou en plastique rigide sont à exclure afin de réduire les risques de saignement. M^{me} Peigue Lafeuille insiste tout particulièrement sur ce point qui, selon elle, représente une des règles d'or en virologie moléculaire ; l'hémoglobine étant en effet un inhibiteur de la PCR.

La cellularité des prélèvements est également importante et peut avoir un impact sur la sensibilité du test de détection d'HPV. M^{me} Peigue-Lafeuille considère qu'il est nécessaire que le prélèvement contienne un nombre suffisant de cellules à la fois de l'endocol et de l'exocol afin de pouvoir associer la présence d'une lésion CIN2 à celle du virus. Il existe en effet une répartition cartographique différentielle des génotypes HPV HR avec une présence plus fréquente d'HPV 18 dans les adénocarcinomes de l'endocol.

Après prélèvement, les cellules doivent être déchargées impérativement dans le milieu de transport recommandé dans la notice d'utilisation du fabricant du test HPV. Ce milieu doit en cas d'utilisation du frottis pour la cytologie et la virologie convenir aux deux.

D'où l'importance qu'en amont, le biologiste transmette à l'anatomocytologiste une notice claire qui précise les milieux validés pour la technique de détection d'HPV utilisée dans son laboratoire.

Sur les conditions de transport, M^{me} Peigue-Lafeuille rappelle une fois de plus la nécessité de se conformer strictement aux recommandations du fabricant du test HPV, le délai de conservation de même que la température étant définis de façon claire dans la notice.

Pour l'étape de libération des acides nucléiques, si celle-ci n'est pas incluse dans la trousse de détection, M^{me} Peigue-Lafeuille recommande d'utiliser impérativement celle validée par le fournisseur du test et surtout ne pas adapter une méthode en fonction de l'équipement du laboratoire. Par ailleurs, si l'extraction et l'amplification ne sont pas faites en continu, il faut congeler les acides nucléiques entre les deux étapes.

A ce propos, M^{me} Peigue-Lafeuille rappelle une autre règle d'or en virologie moléculaire : limiter les cycles congélation/décongélation en raison de leur impact délétère sur les acides nucléiques.

Sur le rendu des résultats, malgré la pratique habituelle du biologiste à transmettre directement les résultats à la patiente (dans le droit français, les résultats appartiennent au patient), M^{me} Peigue-Lafeuille estime qu'en raison de la complexité d'interprétation propre à l'infection HPV, qui doit être lue à la lumière du contexte clinique et anatomo pathologique, le résultat devrait être annoncé par le médecin qui en aura fait la synthèse afin d'éviter à la patiente une angoisse parfois inutile. Comme pour les conditions pré-analytiques, il doit y avoir une concertation entre les différents acteurs de la chaîne (gynéco, ACP et virologistes) quant à la manière dont est rendu le résultat de virologie, ainsi que celui de cytologie.

Interrogée sur l'étape qu'elle considèrerait comme la plus cruciale dans la chaîne pré-analytique, M^{me} Peigue-Lafeuille cite : « le bon prélèvement avec la bonne cellularité dans le bon milieu, qui est celui préconisé par la trousse de détection ».

En conclusion

M^{me} Peigue-Lafeuille insiste sur la nécessité de veiller à ce que tous les principes de base suivants soient bien respectés :

- identifier et étiqueter les prélèvements conformément au GBEA ;
- réaliser le frottis avec un matériel souple ;
- éviter le matériel dur qui peut provoquer le saignement (hémoglobine inhibiteur de PCR) ;
- éviter la présence de produits chimiques locaux, médicaments, lubrifiants, gels également inhibiteurs de PCR ;

- veiller à ce que le prélèvement ait une bonne cellularité et contienne à la fois des cellules de l'endocol et de l'exocol ;
- utiliser strictement les milieux de transport préconisés par le fabricant de la trousse de détection ;
- informer tous les effecteurs de la chaîne (gynécologues, anatomopathologistes, et biologistes) via des réunions de concertation du matériel et du milieu de transport à utiliser conformément aux instructions du fabricant ;
- vérifier l'étanchéité des flacons avant envoi ;
- réaliser un double emballage avant envoi ;
- respecter les conditions de conservation (délai et température) du prélèvement préconisées par le fabricant du test HPV ;
- Eviter les cycles de congélation/ décongélation des acides nucléiques.

Enfin, M^{me} Peigue-Lafeuille conclut que la règle universelle est de « suivre les instructions du fabricant ».

Cette règle est par ailleurs celle préconisée par le GBEA et par la norme NF EN ISO 15189.

M^{me} Peigue-Lafeuille revient sur cette règle en soulignant qu'en cas de litige, la responsabilité légale du fabricant ne peut être engagée que si les instructions qu'il préconise ont au préalable été strictement respectées. Le moindre écart à cette règle l'exonère de toute responsabilité en cas de résultats non conformes et engage par ailleurs celle de l'effecteur.

Compte rendu de l'audition de M. LEVÊQUE

31 mai 2013

En préambule, M. Levêque a décrit l'organisation propre à l'établissement dans lequel il exerce. Depuis 5 années environ le frottis en phase liquide a été adopté dans cet établissement qui réalise plus de 7000 à 8000 examens cytologiques par an dont une grande part correspond à des recrutements de « seconde main », de patientes envoyées au CHU pour un deuxième avis sur frottis pathologique.

La technique de cytologie utilisée pour les frottis, est le système ThinPrep® automatisé où les flacons ne sont pas ouverts, ils sont placés directement dans le processeur. Le milieu de transport adopté après concertation entre les virologues et les anatomocytopathologistes du CHU Rennes est le milieu ThinPrep®, compatible par ailleurs avec la trousse PapilloCheck (Greiner BioOne) utilisée pour la détection d'HPV.

M. Levêque qui se trouve en début de la chaîne préanalytique reçoit de la part du service d'anatomocytopathologie le matériel nécessaire au prélèvement (brosses et flacons avec du milieu ThinPrep®).

Concernant l'étape de prélèvement, M. Levêque a décrit sa propre pratique qui correspond également à celle de ses collègues du CHU.

Sur le respect des conditions optimales de réalisation du frottis, M. Levêque précise que leur démarche consiste à privilégier en première intention la réalisation du frottis chez la patiente plutôt que d'attendre que les conditions idéales soient réunies. Néanmoins, il rajoute que tous les renseignements concernant la patiente sont transmis à l'anatomocytopathologiste et au virologue de même qu'il est clairement signalé à la patiente que le frottis pourrait ne pas être de bonne qualité et qu'elle pourrait éventuellement être convoquée pour un nouveau frottis.

M. Levêque rapporte que les prélèvements sont réalisés avec des speculums (utilisés sans lubrifiant, remplacé par un humidifiant) et des dispositifs de prélèvement adaptés à la morphologie de la patiente. Si celle-ci est jeune et que l'ectropion du col est bien visualisé, il est privilégié un prélèvement par brosse de type Cervex Brush®, si la patiente est plus âgée et que l'ectropion est moins bien visualisé, c'est plutôt la cytobrosse qui est utilisée. Après quelques rotations réalisées à la surface du col, les dispositifs de prélèvement sont déchargés dans les tubes avec les milieux ThinPrep®.

Les tubes sont ensuite directement étiquetés et une fiche est remplie à l'intention des cytopathologistes avec les données cliniques de la patiente. En cas d'éléments cliniques particuliers, par exemple un frottis ASC-US qui perdure, le gynécologue contacte directement l'anatomocytopathologiste pour lui signaler les difficultés particulières du dossier. Les mêmes renseignements sont également transmis au virologue.

Les prélèvements sont ensuite confiés à l'infirmière qui opère un deuxième contrôle d'identification et garde les prélèvements à température ambiante jusqu'à la transmission à la structure d'anatomocytopathologie soit le jour même ou le lendemain en fonction des horaires de fermeture des consultations.

En cas de frottis ASC-US, l'option adoptée par l'établissement après concertation entre gynécologues, anatomocytopathologistes et virologues est la réalisation d'emblée du test HPV. Néanmoins, dans le cas de patientes dont l'âge est inférieur à 30 ans, il est plutôt privilégié un contrôle à 6 mois, car l'intérêt d'un test HPV est discutable dans cette situation qui ne correspond pas à du triage.

M. Levêque rapporte que le circuit de transmission du prélèvement, des renseignements cliniques et des résultats est bien coordonné dans leur structure.

Sur la transmission des résultats, M. Levêque précise qu'ils ne sont jamais envoyés directement à la patiente. Dans un premier temps les conclusions de l'examen cytopathologique reviennent vers le gynécologue, si le frottis est ASC-US le résultat de la virologie est adressé ultérieurement au gynécologue. Le rendu du résultat du test HPV est un résultat qualitatif avec précision du génotype détecté.

Interrogée sur ce qu'il considèrerait comme susceptible de présenter un écueil au niveau de la chaîne pré-analytique, M. Levêque considère qu'à son niveau, ça serait en priorité un prélèvement très peu cellulaire sur lesquels le test HPV serait non contributif.

M. Levêque revient sur un autre point qu'il considère comme étant un des plus importants dans le contexte du test HPV, il s'agit de la concertation entre les différents effecteurs de la chaîne et la mise en place d'un circuit de transmission d'informations clair et coordonné.

.

Annexe 9. Liste des tableaux

Liste des tableaux du rapport d'évaluation technologique

Tableau 1. Nombre de cytologies	15
Tableau 2. Nombre de cytologies réalisées sur frottis conventionnel et sur frottis en phase liquide ^{1,2}	15
Tableau 3. Nombre de recherches du génome (ADN) des HPV oncogène	15
Tableau 4. Pourcentage de recherches d'HPV par rapport au nombre de cytologies	16
Tableau 5. Prévalence des différents types HPV en fonction des sites de prélèvements	44
Tableau 6. Résultats des types d'HPV détectés à partir de prélèvements réalisés à l'aide d'écouvillons secs ou en milieu STM chez 9 patientes présentant un diagnostic cytologique de type HSIL ou Cancer	52

Liste des tableaux des annexes du rapport d'évaluation technologique

Tableau 1. Stratégie de recherche dans la base de données <i>Medline</i>	6
Tableau 2. Stratégie de recherche dans la base de données Pascal.	7
Tableau 3. Tableau de Degré d'accord et valeur de Kappa.	10
Tableau 4. Impact de la technique de prélèvement et du matériel utilisé pour le prélèvement sur la détection d'HPV.	18
Tableau 5. Impact du site de prélèvement.	20
Tableau 6. Impact de la composition du milieu sur les résultats des tests de détection et/ou génotypage.	22
Tableau 7. Impact de la durée et de la température de conservation de l'échantillon avant la réalisation des tests de détection d'HPV.	26
Tableau 8. La libération des acides nucléiques.	28
Tableau 9. Modifications de conditions PCR.	32

Fiche descriptive

Intitulé	Descriptif
Méthode de travail	Évaluation d'une technologie de santé
Date de mise en ligne	Octobre 2013
Date d'édition	Uniquement disponible sous format électronique sur www.has-sante.fr
Objectif(s)	- Identifier l'impact sur la qualité des résultats du non respect des bonnes pratiques de la technique de recherche et/ou de génotypage des HPV - Définir les bonnes pratiques de réalisation permettant de garantir la qualité des résultats
Professionnel(s) concerné(s)	Cf. chapitre 3.2 du rapport d'évaluation technologique
Demandeur	Le Centre national de référence (CNR) des papillomavirus humains (<i>Human Papilloma Virus</i> – HPV)
Promoteur	Haute Autorité de Santé (HAS) : Service évaluation des actes professionnels (SEAP) & Mission Juridique (MJ)
Pilotage du projet	Coordination : Nadia ZEGHARI-SQUALLI, chef de projet, SEAP (chef de service : Michèle MORIN-SURROCA, adjoint au chef de service : Denis-Jean DAVID), en collaboration avec Catherine DELAMARE, chargée de projet, SEAP Analyse juridique : Pauline AUBRY, chef de projet, MJ, sous la responsabilité de Christine VINCENT Secrétariat : Christine MAYOL, assistante, SEAP
Participants	Expertise externe à la HAS : Geneviève AILLET, Christine BERGERON, Christine CLAVEL-CRAVOISIER, Isabelle HEARD, Jean LEVÉQUE, Jean-Luc MERGUI, Hélène PEIGUE-LAFEUILLE, Michèle RIVIÈRE, Jean-Luc SCHMIT, Henri SEVESTRE, Jean-Paul TAAR Cf. chapitre 3.2.3 du rapport d'évaluation technologique
Recherche documentaire	De novembre 2011 à avril 2013 (stratégie de recherche documentaire décrite en annexe 2) Réalisée par Sophie DESPEYROUX, documentaliste, avec l'aide de Renée CARDOSO, assistante documentaliste, sous la responsabilité de Frédérique PAGÈS, chef du Service documentation - information des publics, et Christine DEVAUD, adjointe au chef de service
Auteurs de l'argumentaire	Nadia ZEGHARI-SQUALLI, chef de projet, SEAP, sous la responsabilité de Denis-Jean DAVID, adjoint au chef de service, SEAP en collaboration avec Catherine DELAMARE, chargée de projet, SEAP Pauline AUBRY, chef de projet, MJ, sous la responsabilité de Christine VINCENT
Validation	Examen par la Commission nationale d'évaluation des dispositifs médicaux et des technologies de santé (CNEDiMTS) : 23 juillet 2013 Collège de la HAS : 2 octobre 2013
Autres formats	Pas d'autre format que le format électronique disponible sur www.has-sante.fr
Documents d'accompagnement	Texte court du rapport d'évaluation technologique, rapport d'évaluation technologique, Décision HAS (octobre 2013) disponibles sur www.has-sante.fr

N°ISBN : 978-2-11-138076-9



Toutes les publications de l'HAS sont téléchargeables sur
www.has-sante.fr