

# Détecter les papillomavirus oncogènes : chaque intervenant joue un rôle important

## Tout se joue avant l'ADN

La recherche du génome (ADN) des papillomavirus humains (HPV) oncogènes est recommandée et prise en charge par l'Assurance maladie lorsqu'un frottis cervico-utérin (FCU) a retrouvé des cellules malpighiennes de signification indéterminée (ASC-US, *atypical squamous cells of undetermined significance*). Cette recherche est effectuée par des biologistes médicaux ou par des anatomo-cytopathologistes (ACP).


Au cours des différentes étapes de la phase pré-analytique de cet examen, qui va de la décision à la réalisation, plusieurs facteurs concernant l'ensemble des professionnels de santé intervenant dans cette phase sont susceptibles d'avoir un impact sur la qualité du résultat.

Cette fiche énumère, étape par étape, les conditions optimales de réalisation de la phase pré-analytique de la recherche de l'ADN des HPV oncogènes.

### Contexte

- **La recherche de l'ADN des HPV oncogènes** est l'une des options préconisées lorsque l'examen cytologique du FCU a conclu à un ASC-US, c'est-à-dire dans 3 à 5 % des FCU.
- **Les FCU peuvent être réalisés par plusieurs professionnels de santé** : gynécologue, médecin généraliste, sage-femme, etc.  
**La recherche de l'ADN des HPV peut être réalisée par deux professionnels de santé** : un biologiste médical ou un anatomo-cytopathologiste (ACP). Cette recherche peut être effectuée à partir du FCU qui a d'abord servi à réaliser l'examen cytologique, s'il s'agit d'un FCU déchargé en milieu liquide, ou à partir d'un second FCU réalisé dans ce seul but si celui ayant servi pour la cytologie avait été étalé sur lame (frottis conventionnel).
- **Plusieurs milieux de conservation de FCU et plusieurs trousse de recherche d'HPV** sont commercialisés et utilisés en France. Par ailleurs, certains laboratoires n'utilisent pas les trousse commercialisées mais mettent en œuvre des techniques dites « maison ».
- Dans un tel contexte, très multifactoriel, **les risques d'erreurs peuvent être multiples**. C'est pourquoi la HAS a conduit un travail afin, d'une part, d'**identifier les facteurs pré-analytiques susceptibles d'altérer les résultats de la recherche de l'ADN des HPV oncogènes** et, d'autre part, d'**établir les conditions optimales de réalisation de la phase pré-analytique de ces tests**.

## Modalités de réalisation du frottis cervico-utérin en vue de la recherche du génome des HPV

- **Les conditions optimales de réalisation d'un FCU** doivent autant que possible respecter les consignes suivantes :
    - éviter le prélèvement pendant la période des règles ;
    - éviter les contextes d'inflammation ou d'infection vaginale ;
    - éviter les rapports sexuels dans les 24 heures précédant le prélèvement ;
    - éviter la grossesse, le post-partum et l'allaitement ;
    - éviter toute sollicitation physico-chimique en amont de la réalisation du frottis : examen vaginal, crème ou liquide désinfectant, gel lubrifiant, médicaments vaginaux, douche vaginale ou gel spermicide (moins de 24 heures avant), colposcopie avec acide acétique (moins de 24 heures avant), frottis (moins de 3 semaines avant), chirurgie cervicale (moins de 3 mois avant), radiothérapie ;
    - chez les femmes ménopausées, appliquer localement des œstrogènes 4 à 5 jours avant pour faciliter le prélèvement au niveau de l'endocol.
  - Le frottis doit être réalisé **sous contrôle visuel** avec un spéculum adapté à l'âge et à la morphologie locale de la patiente.
  - Le préleveur doit **privilégier un matériel en plastique souple** pour, d'une part, **limiter les saignements** (le sang étant un inhibiteur de PCR\*) et, d'autre part, **recueillir le maximum de cellules** (le FCU peut aussi être utilisé pour réaliser une cytologie).
    - Il doit **éviter d'utiliser un matériel de prélèvement dur** (qui provoque le saignement), **notamment des spatules d'Ayre, sauf pour les femmes ménopausées** en raison de la sténose et de l'obstruction de l'orifice externe du col utérin.
    - Il doit aussi **éviter d'utiliser un matériel absorbant** (coton).
  - Le site de prélèvement privilégié se situe au **niveau de la zone de jonction endocol/exocol**.
    - Le prélèvement concerne **la totalité de l'orifice cervical externe et l'endocol**.
    - Le préleveur doit brosser la totalité de l'orifice cervical externe et l'endocol **avec le matériel recommandé** par le fabricant du milieu de transport et en opérant **autant de rotations que préconisé** par le fabricant.
  - Le préleveur doit **décharger immédiatement le prélèvement** dans **un milieu de transport validé pour la technique qui sera ensuite utilisée pour rechercher le génome (ADN) des HPV oncogènes**, conformément aux instructions des fabricants de cette technique ou conformément aux procédures propres de la structure qui effectue la recherche d'HPV.
-  **Tous les milieux de conservation de FCU ne sont pas prévus pour être utilisés avec toutes les trouses de détection d'ADN des HPV, et inversement.**
- **Si le milieu de transport et la trousse de détection sont marqués CE**, respecter les préconisations de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DMDIV) en utilisant une combinaison validée par les fabricants afin de ne pas porter atteinte aux performances prévues des dispositifs.
  - **Dans les autres situations**, c'est-à-dire en cas d'utilisation de produits non marqués CE et/ou de combinaison de milieux et de réactifs non validée par le fabricant, **les techniques devront être validées** par des études et faire l'objet de procédures et de modes opératoires détaillés.

\* La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique employée pour détecter *in vitro* des séquences d'ADN spécifiques à partir d'un échantillon peu abondant (dans ce cas, pour détecter l'ADN des HPV oncogènes à partir d'un FCU).

## Identification du prélèvement, transmission du prélèvement et des informations cliniques

- **La transmission des informations** relatives à toutes les étapes pré-analytiques **doit être systématique** entre tous les professionnels de santé impliqués, quels que soient leurs modes et lieux d'exercice.

Avant le frottis cervico-utérin, la structure qui réalise le test HPV (cabinet d'ACP ou laboratoire de biologie médicale) fournit au clinicien réalisant le frottis (gynécologue, médecin généraliste, sage-femme, etc.) et à l'ACP **toutes les précisions utiles aux conditions de mise en œuvre du test HPV.**

- ⚠ **Le FCU est associé à une fiche de suivi médical**, adressée au laboratoire ou au cabinet d'ACP, comportant **tous les renseignements nécessaires** à la bonne exécution des analyses (cytologie et test HPV) et à l'interprétation des résultats. Cette fiche comporte les éléments suivants :

- identification du prescripteur ;
- nom et prénom de la patiente (éventuellement, nom de jeune fille) ;
- date de naissance ;
- éventuels antécédents gynécologiques et thérapeutiques (traitement du col, chimiothérapie, hormonothérapie, radiothérapie) ;
- date des dernières règles (ou mention que la femme est ménopausée) ;
- type de contraception utilisée (contraception hormonale, dispositif intra-utérin) ;
- date et résultat du dernier FCU ;
- motif de l'examen (dépistage, contrôle) ;
- date du prélèvement ;
- localisation du prélèvement ;
- conditions de conservation (délai et température) ;
- toutes informations sur les gestes techniques (exemple : frottis réalisé hors conditions optimales chez une femme n'ayant pas de suivi gynécologique régulier) et sur les éventuels prétraitements réalisés sur les échantillons entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire qui réalise la détection de l'HPV (exemple : éventuel traitement par acide acétique).

- **Le récipient** destiné à recevoir l'échantillon biologique est adapté à la nature de l'échantillon et à celle des analyses.
- **L'étiquetage** est conçu pour éviter toute erreur sur l'identité de la personne. Il mentionne, outre l'identité (nom et prénom, éventuellement nom de jeune fille) et la date de naissance, la nature de l'échantillon, le nom du préleveur, son lieu d'exercice et la date du prélèvement.
  - 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 informations ci-dessus sont mentionnées de façon à éviter toute erreur.
  - Si un étiquetage code-barres est utilisé, il ne doit pas masquer les renseignements énoncés en clair.
- À réception du FCU, le biologiste médical ou l'ACP met en place, en liaison avec le préleveur, une procédure permettant de **lier l'échantillon biologique à la patiente.**
- Lors de la préparation de fractions aliquotes, **l'étiquetage des tubes ou récipients secondaires** se fait selon des procédures rigoureuses permettant l'identification sans ambiguïté de chaque échantillon.

## Transport et conservation des FCU déchargés en phase liquide

- **Des procédures et des modes opératoires écrits par la structure qui effectue le test HPV** fixent les conditions particulières de délai de transport, de température de conservation et d'intégrité de l'emballage des échantillons biologiques.
- **Le transport des FCU** respecte les règles qui assurent l'intégrité de l'échantillon et la sécurité des personnels.
  - Il s'effectue **le plus rapidement possible** du cabinet du préleveur à la structure qui réalise le test HPV, en prenant toutes les précautions pour éviter les risques de contamination et de dégradation des constituants.
  - Le récipient étanche contenant l'échantillon doit être **inséré dans une boîte étanche**, tapissée par un matériau absorbant. L'ensemble est 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.
- **La fiche de suivi médical** (voir page précédente) ou sa copie, ou, à défaut, une fiche de renseignements établie par la structure qui réalise le test HPV, **doit être associée à l'échantillon**.

## À l'arrivée dans la structure qui réalise le test HPV

- ⚠ **Les conditions d'identification, de fermeture des récipients et de température de conservation des échantillons doivent être rigoureusement observées** pour éviter tout risque d'erreur, de modification qualitative et/ou quantitative et de contamination.
  - **La date et l'heure de réception** des échantillons doivent être enregistrées.
  - **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.
  - **La température et la durée de conservation** des échantillons doivent être fixées par la structure qui réalise le test et inscrites sur ses procédures opératoires ; elles doivent être conformes aux instructions du fabricant du test HPV ou aux procédures propres à la structure qui effectue la recherche d'HPV.
- **Le biologiste médical ou l'ACP vérifie la conformité des échantillons** acceptés dans sa structure en fonction des techniques et procédures qui y sont pratiquées.
  - **Il s'assure de la cellularité suffisante des échantillons** et de **l'absence d'inhibiteur de PCR** (sang et produits chimiques), qui sont deux facteurs pouvant donner lieu à des résultats faussement négatifs.
  - Il est en droit de **refuser tout échantillon prélevé ou transmis dans des conditions non conformes aux procédures** techniques et réglementaires.
- **Si les tests de détection ne sont pas réalisés à la suite**, les échantillons et leurs fractions aliquotes peuvent être :
  - soit congelés directement dans le milieu de transport et conservés à -70 °C (limiter les cycles de congélation-décongélation) ;
  - soit préalablement centrifugés (dans ce cas, le traitement du culot d'ADN devra être réalisé selon les recommandations du fabricant du test ou selon les procédures propres à la structure qui effectue la recherche d'HPV).