

# Hybrid Capture 2: MONITORAGGIO DELLA RIPRODUCIBILITÀ UTILIZZANDO SISTEMI DI ANALISI MANUALE E SEMI-AUTOMATICA

De Marco L<sup>1,2</sup>, Rubino T<sup>3</sup>, Fodero C<sup>3</sup>, Campari C<sup>4</sup>, Allia E<sup>2</sup>, Girlando S<sup>5</sup>, Dalla Palma P<sup>5</sup>, Prandi S<sup>3</sup>, Segnan N<sup>6</sup>, Ghiringhello B<sup>7</sup>, Sapino A<sup>2</sup>, Ronco G<sup>6</sup>, Gillio Tos A<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Epidemiologia dei Tumori- CeRMS- Università di Torino - <sup>2</sup> Centro Unificato Screening Cervico-Vaginale, AOU S.Giovanni Battista - SGAS, Torino - <sup>3</sup> Centro di citologia cervico-vaginale di screening, Arcispedale SMN, IRCCS, Reggio Emilia - <sup>4</sup> Centro Screening, Azienda USL di Reggio Emilia - <sup>5</sup> Ospedale S.Chiara, Trento - <sup>6</sup> Centro per la Prevenzione Oncologica, Torino - <sup>7</sup> Ospedale OIRM-S.Anna, Torino

## INTRODUZIONE

Nel 2010 in 3 centri del Nord-Italia (**Torino**, Trento, **Reggio-Emilia**) è stato avviato uno Studio Pilota per la valutazione dell'applicazione del test HPV (*Hybrid Capture 2*, Digene-Qiagen, Hilden, Germany) come test primario di screening del tumore cervicale.

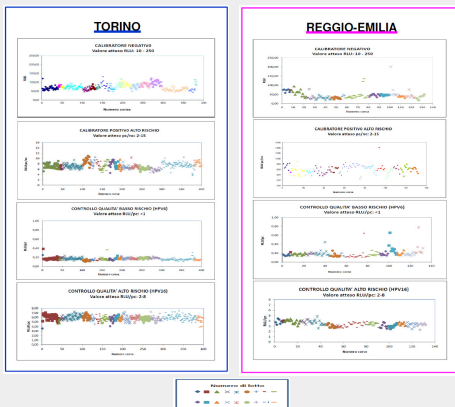
Al momento non sono disponibili dati di riproducibilità dei risultati finali ottenuti confrontando l'utilizzo di sistemi di rilevazione manuale e semi-automatica. L'allestimento di un controllo di qualità intra-, inter ed extra-laboratorio tra i centri partecipanti può fornire indicazioni sull'omologia della *performance* dei 2 sistemi analitici.

## OBIETTIVI DELLO STUDIO

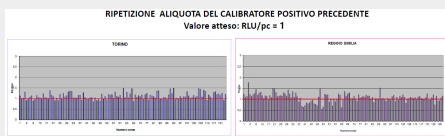
Monitoraggio della qualità: accuratezza e precisione dei risultati ottenuti con *Hybrid Capture 2* presso i 2 laboratori in cui sono stati effettuati tutti i test per l'identificazione di HPV-DNA utilizzando sistemi di rilevazione **manuale** a **Reggio-Emilia** e piattaforma **semi-automatica Rapid Capture System** a **Torino**.

## RISULTATI

### a. Controlli di qualità **intra-laboratorio**



- I quattro controlli interni forniti con il kit sono risultati sempre nei range definiti dal distributore, con ampio margine rispetto ai limiti preposti.
- I valori assoluti di RLU ottenuti con il sistema **manuale** a **Reggio-Emilia** sono quasi sempre inferiori a quelli ottenuti con piattaforma **semi-automatica Rapid Capture System** a **Torino**. Ciò non inficia i risultati perché i ratio RLU/pc con i due sistemi analitici sono similari.



- Dalla ripetizione (N=255) dell'aliquota del Calibratore positivo si è ottenuto nei due centri un valore medio di 1.098 (IC: 1.076-1.119).
- L'accuratezza (risultato atteso positivo) è risultata pari al 73% nel centro di **Reggio-Emilia** e al 78% nel centro di **Torino**. A **Torino** il 73% delle ripetizioni ha valori compresi tra 0.90 e 1.1, a **Reggio-Emilia** il 63%.



- Complessivamente la ripetizione di un campione positivo della sedute precedente presenta elevata accuratezza per entrambi i centri: soltanto 2 esiti discordanti su 182, e valori di ICC superiori a 0.82.
- Confrontando i 2 valori di ratio ottenuti per singolo campione, ammettendo una variabilità tollerabile tra le sedute si ottiene un grado di precisione soddisfacente.

## CONCLUSIONI

- I dati ottenuti con *Hybrid Capture 2* supportano un'elevata riproducibilità dei risultati in termini di accuratezza indipendentemente dalla strumentazione analitica utilizzata, ad eccezione dei risultati *border line* (vicini al Cut Off) che hanno riproducibilità più limitata con entrambi i sistemi. Tale risultato suggerisce la ripetizione del test HPV con esito negativo con ratio RLU/pc compreso tra 0.90 e 0.99 prima di escludere una positività clinicamente significativa. I due sistemi hanno buona omologia di *performance*.

- Le ripetizioni delle aliquote di campioni con esito positivo della sedute precedente e i risultati dei controlli inter-laboratorio suggeriscono elevata riproducibilità non solo in termini di accuratezza, se si escludono gli esiti *border line*, ma anche di precisione.

- I range di accettabilità consigliati dal produttore per i controlli interni potrebbero essere ulteriormente ristretti senza inficiare la *performance* dei laboratori.

## METODI

Tutti i test per l'identificazione di HPV-DNA (attualmente >35.000) sono stati effettuati presso i laboratori di **Reggio-Emilia** con sistema di rilevazione **manuale** e di **Torino** con piattaforma **semi-automatica Rapid Capture System**.

Il monitoraggio della qualità è stato effettuato introducendo:

- Controlli di qualità **intra-laboratorio** inseriti in ogni seduta

CDQ INTRA-LABORATORIO		
	VALORI ATTESI	ORIGINE
Calibratore negativo (nc)	RLU: 10 - 250	forniti nel kit di analisi
Calibratore positivo (pc)	RLU/pc: 2 - 15	forniti nel kit di analisi
Controllo di qualità a basso rischio (HPV 6, 5 pg/ml)	RLU/pc: <1	forniti nel kit di analisi
Controllo di qualità ad alto rischio (HPV 16, 5 pg/ml)	RLU/pc: 2-8	forniti nel kit di analisi
aliquota del pc utilizzato nella seduta precedente	RLU/pc ~ 1	aliquota conservata a -20°C
un campione della seduta precedente con RLU/pc compresi tra 1 e 20	RLU/pc sovrapponibile al risultato della seduta precedente	aliquota conservata a -20°C

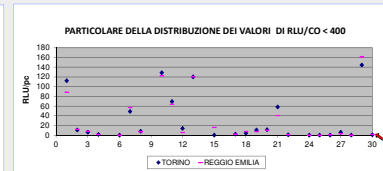
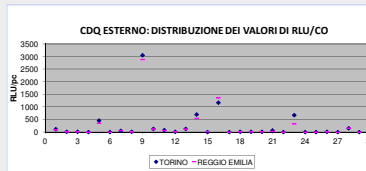
- Controlli di qualità **inter-laboratorio**: 3 campioni in cieco raccolti in STM (Specimen Transport Medium, Digene-Qiagen) sono stati spediti mensilmente dal laboratorio di **Torino** al laboratorio di **Reggio-Emilia** e i risultati sono stati raccolti presso il centro di Torino.

- Controlli di qualità **extra-laboratorio**: il centro di **Torino** ha partecipato al programma di valutazione esterna della qualità QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics, Nanogen, Torino, Italy) per gli anni 2010-2011.

Come misura di riproducibilità dei risultati sono stati calcolati il *k* di *Concordanza (Cohen)* e l'*indice di correlazione intraclassa (ICC)*.

I campioni con RLU/pc *border line* (0.90-0.99) sono stati ripetuti.

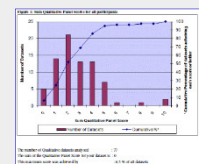
### b. Controlli di qualità **inter-laboratorio**



- I controlli inter-laboratorio (N=30) presentano una concordanza ottima ( $k = 0,91$ ) e un  $ICC=0,99$
- 1 solo campione (#30) con ratio vicina al Cut Off non ha soddisfatto i criteri di accuratezza risultando negativo a **Torino** (RLU/pc=0.94) e positivo a **Reggio-Emilia** (RLU/pc=1.13).
- il grado di precisione dei risultati visualizzato nei grafici per i due centri è molto soddisfacente.

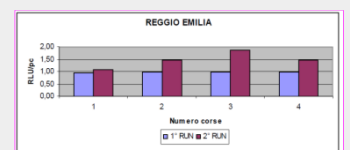
### c. Controlli di qualità **extra-laboratorio**

Numero di centri laboratori partecipanti in ogni categoria campione									
Nota: 2: Non Accettato / 3: Accettato / 4: Accettato con note di performance scarse									
Numero	Grado Controllo	Grado Risultato	Grado Tempo	Grado Accuratezza	Grado Precisione	Grado Sicurezza	Grado Qualità	Grado Servizio Clienti	Grado Altro
1	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
2	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
3	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
4	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
5	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
6	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
7	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
8	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
9	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
10	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
11	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
12	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
13	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
14	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
15	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
16	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
17	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
18	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
19	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
20	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
21	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
22	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
23	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
24	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
25	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
26	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
27	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
28	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
29	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato
30	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato	Accettato



- Con la valutazione esterna della qualità QCMD è stata ottenuta la proficiency per la sensibilità clinica.

### Ripetizione campioni negativi con RLU/pc *border line*



- complessivamente nei 2 centri la ripetizione dell'analisi dei campioni (N=35) con RLU/pc *border line* (0.90-0.99) ha confermato esiti negativi nel 43%.