

# Convegno Nazionale GISCi 2015

Venerdì 22 Maggio 2015

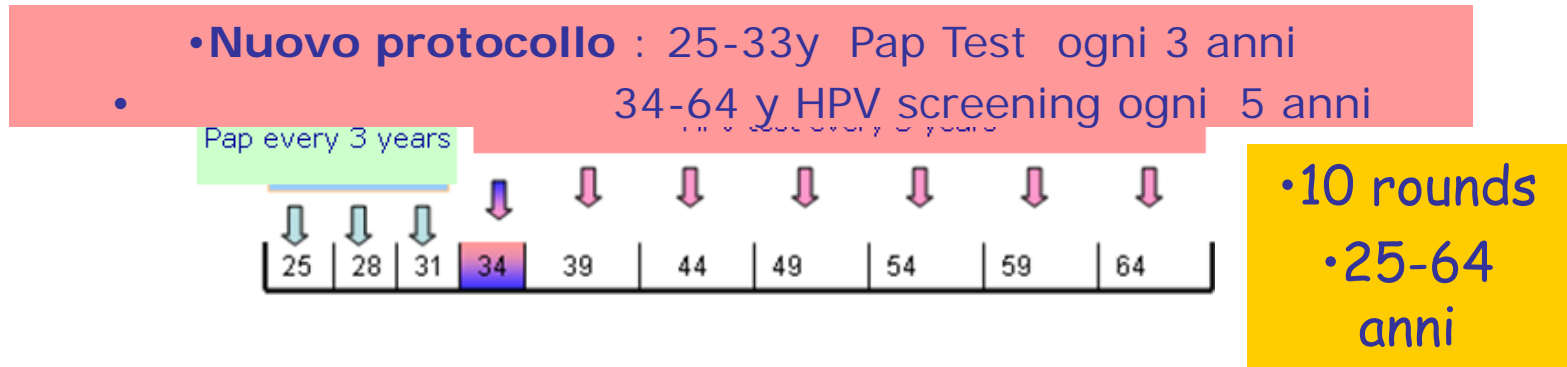


**Complesso monumentale di Santa Caterina,  
Finalborgo, Finale Ligure (SV)**

**Esperienza nella pratica  
di VEQ per test HPV  
primario di screening in  
programmi già avviati**

**Elena Burroni**  
Istituto per lo Studio e la Prevenzione  
Oncologica (ISPO), Firenze

# Il test HPV nello screening cervicale



- Regione Toscana: introduzione del test HPV primario dal 2013
  - Per fasce d'età (55-64 anni, 45-54 anni, 34-45 anni)
  - Per ASL (prime ASL -> Firenze, Viareggio, Grosseto)

# Il test HPV nello screening cervicale

## Alcuni dei HPV TEST validati\* per lo screening

- HC2 Qiagen:
  - probe B individua 12 tipi HR + HPV 68
- Cervista : pooled 12 hr types + HPV 68+HPV66
  - 16/18 : is run as a ‘reflex’ assays on women who are hr HPV positive (pooled types)
- Cobas HPV test real time PCR
  - Detects 12 pooled hr-HPV types + HPV 66+HPV 68
  - simultaneously provide information on 16 and 18 separately
- Abbott Real Time High risk HPV:
  - detects 12 hr HPV types + HPV 68+ HPV 66
  - simultaneously provide information on 16 and 18 separately
- BD HPV Viper Assay
  - detects 12 hr HPV types + HPV 68+ HPV 66
  - concurrent individual genotyping of 16,18,31,45,51,52 (33/58), (56/59/66), (35/39/68)

\*No-one only 12 HR IARC HPV types



# Il test HPV nello screening cervicale

Nello screening è di fondamentale importanza rilevare le infezioni da HPV clinicamente rilevanti perché il test HR-HPV **rappresenta un test di rischio oncogeno**, e non è un test virale

## VEQ per HR-HPV nel contesto dello screening

Il test HPV test deve essere validato per la sensibilità e la specificità clinica in un contesto di screening:

Il cut-off utilizzato in questo contesto non corrisponde al livello minimo di virus rilevabile dal metodo

Quindi le VEQ devono essere costruite e ottimizzate appositamente per i test HPV di screening per valutare la performance clinica del test



# Perché partecipare alle VEQ – (Valutazione Esterna della Qualità)?

*“... il laboratorio deve svolgere programmi di Controllo Interno di Qualità e partecipare a programmi di Valutazione Esterna di Qualità promossi dalle Regioni o, in assenza di questi, a programmi validati a livello nazionale o internazionale ...”*

D.P.R. 14 gennaio 1997 n.37 (Gazz.Uff. 20 febbraio 1997,n.42, S.O.). Decreto sui requisiti minimi strutturali, tecnologici ed organizzativi per l'esercizio delle attività sanitarie da parte delle strutture pubbliche e private ([http://www.ministerosalute.it/imgs/C\\_17\\_normativa\\_1163\\_allegato.pdf](http://www.ministerosalute.it/imgs/C_17_normativa_1163_allegato.pdf) ).



# Perché partecipare alle VEQ – (Valutazione Esterna della Qualità)?

Permette di confrontare il valore ottenuto per un determinato parametro con quello ottenuto da altri laboratori

Consente di:

- verificare l'**accuratezza** nelle misure analitiche del singolo laboratorio rispetto agli altri laboratori partecipanti
- Valutare l'**attendibilità dei risultati** di un laboratorio utilizzando materiale di controllo uguale per tutti i partecipanti

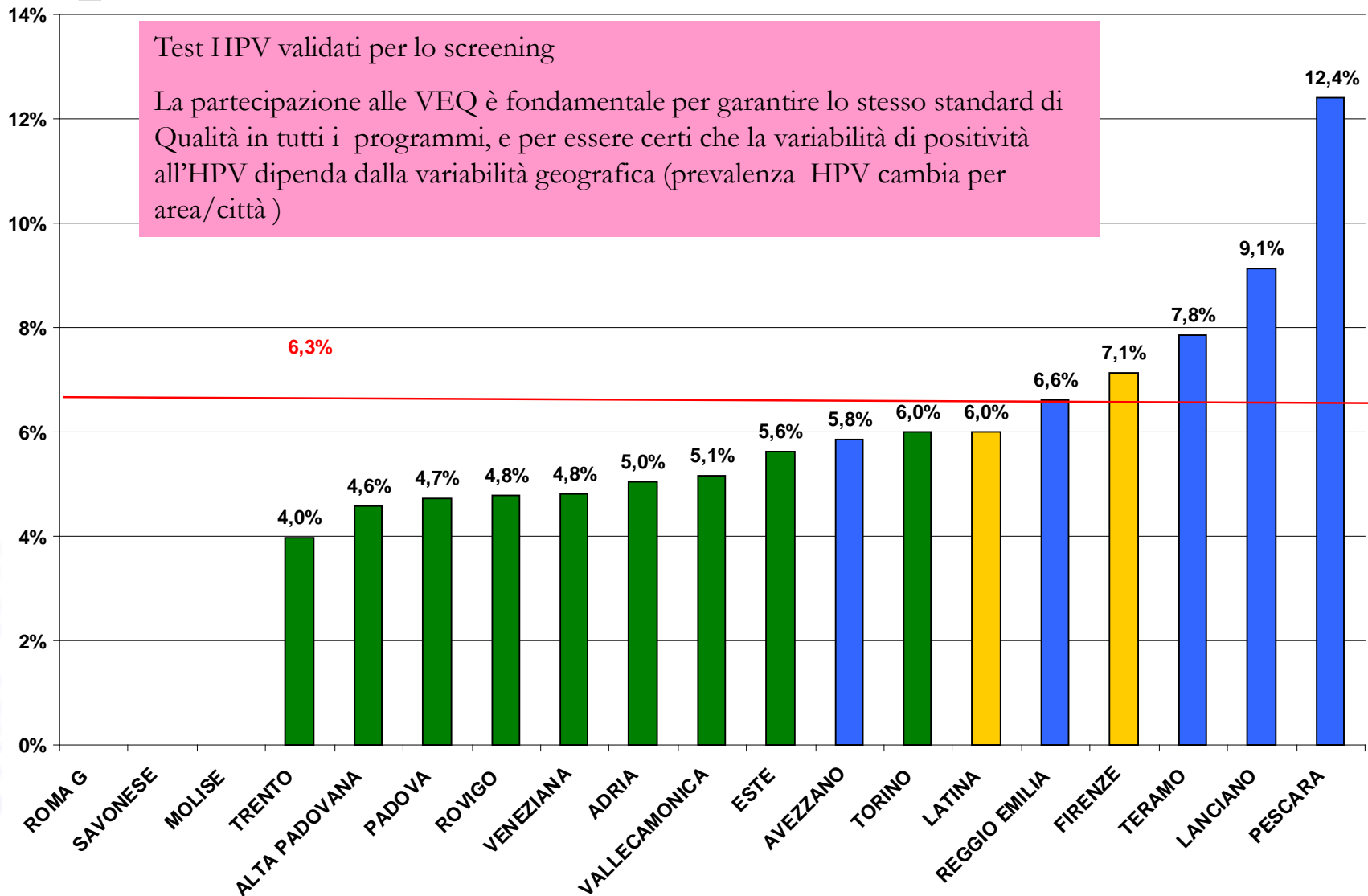
## VEQ per test HR- HPV nello screening

- In virologia con lo sviluppo dei metodi molecolari sono stati raggiunti livelli di sensibilità mai ottenuti con le altre tecniche di rilevazione tradizionali: cruciale per la rivelazione di un'infezione è la elevata sensibilità per il microrganismo che ne è responsabile
- i test HPV validati per lo screening sono settati in base alla sensibilità clinica che non corrisponde alla sensibilità analitica.
- I tipi di HPV da valutare devono essere i 12 tipi considerati ad alto rischio



- NORD
- CENTRO
- SUD e ISOLE

**% di donne 35-64 POSITIVE al Test HPV**



# VEQ disponibili in commercio

## ✦ WHO HPV LabNet (Proficiency Panel) (partecipiamo dal 2010)

Plasmidi. E' un Proficiency Panel annuale. Vengono inviati 46 campioni (43 DNA già estratto+ 3 campioni di sospensioni cellulari da estrarre). Disegnato per valutare le performance dei test di genotipizzazione.

Progettato solo per valutare le performance analitiche dei sistemi di genotipizzazione

## ✦ UK NEQAS (partecipiamo dal 2013)

Materiale di provenienza clinica, 3 invii/anno, 4 campioni/invio – punteggio sulla performance qualitativa (presenza/assenza dei tipi HR HPV) **In ThinPrep**

[www.ukneqas.org.uk](http://www.ukneqas.org.uk)

Gli unici in commercio per testare HPV ma nessuno idoneo per lo screening

## ✦ QCMD (partecipiamo dal 2010)

Campioni clinici. Invio annuale (8-10 campioni). 2 diverse tipologie di campioni: CORE e EDUCATIONAL. Punteggio attribuito in base ai risultati dei campioni CORE. **In Thin Prep**

[www.qcmd.com](http://www.qcmd.com)

## ✦ Dicocare (partecipiamo dal 2010)

(VEQ Italiana) campioni clinici. Campioni inviati al laboratorio 1 volta all'anno. I risultati devono essere restituiti in 4 volte durante l'anno (2 campioni/invio). Disegnato per valutare le performance cliniche delle metodologie usate e dei metodi di genotipizzazione. **Campioni liofilizzati da rispedire nel mezzo appropriato.**

[Online.dicocare.org](http://Online.dicocare.org)

# UK NEQAS: Aspetti Critici dei campioni

- **Campioni in Thin Prep** -> solo per i laboratori che utilizzano questa tipologia di campioni. Non utile per i laboratori che utilizzano un sistema di trasporto diverso (STM, Surepath)
- **Volume non sufficiente per eseguire alcuni test** -> ad esempio non è sufficiente per processare il campione con QIASymphony (preparatore automatico del campione in Thin Prep prima di HC2- RCS)

Soluzione del Laboratorio -> richiesta di materiale sufficiente per le analisi.

# UK NEQAS: Aspetti critici dell'analisi dei risultati

## Analisi dei risultati:

- I risultati sono espressi solo in termini qualitativi (HPV HR presente/non presente). Indicazioni sul tipo di HPV presente in ciascun campione, **MA non danno indicazioni di tipo quantitativo** (Ct, RLU/CO, ...)
- Suddivisa per test utilizzato **MA** senza considerare differenze ulteriori che possono esistere pur utilizzando lo stesso metodo, es. che può essere manuale o automatico, o differenze sul processamento dei campioni -manuale o automatizzato -> **difficoltà di confronto dei dati**

# QCMD: Aspetti critici dell'analisi dei risultati

- **Campioni in Thin Prep** -> solo per i laboratori che utilizzano questa tipologia di campioni. Non utile per i laboratori che utilizzano un sistema di trasporto diverso (STM, Surepath)

Uno degli obiettivi del QCMD è quello di valutare **le performance analitiche** del laboratorio basandosi sul consenso tra i laboratori

**I risultati sono suddivisi in base alla tecnologia utilizzata e NON suddivisi in base al sistema specifico**

Gli RLU e il valore dei Ct sono forniti per i campioni e sono richiesti ai lab, ma non sono utilizzati per il confronto tra metodi o come target per valutare la qualità del laboratorio

**Test validati per lo screening che individuano solo 12-14 HR con una sensibilità clinica e non analitica, possono essere penalizzati nel punteggio educational perché HPV diversi dai target type o avere una carica virale bassissima sotto la soglia prevista per la sensibilità clinica.**

# QCMD

## 4.2. Qualitative analysis of the EQA data for all panel samples

31 Cobas 4800      30 Abbott RT

Number of correct qualitative results per panel member and technology type

Sample code	Sample content	CI Value	RLU	Total datasets n=226		PCR				Hybrid <sup>a</sup> capture n=25	DNA <sup>f</sup> array n=14	LiPA <sup>g</sup> n=29	Other <sup>h</sup> n=14								
						Conventional <sup>a</sup> n=56		Real time													
						In-house <sup>b</sup> n=22	Commercial <sup>c</sup> n=57	In-house <sup>b</sup> n=9													
HPV14-02	HPV16 (Caski)	30.9	6.55	222	98.2	56	100.0	22	100.0	56	98.2	9	100.0	23	92	14	100.0	29	100.0	13	92.9
HPV14-06	HPV18 (Hela)	28.85	5.29	222	98.2	56	100.0	21	95.5	56	98.2	9	100.0	24	96	13	92.9	29	100.0	14	100.0
HPV14-01	HPV45 (CC10b)	28.4	6.39	209	92.5	54	96.4	21	95.5	55	96.5	7	77.8	24	96	5	35.7	29	100.0	14	100.0
HPV14-09	HPV16/18 (Caski/Hela)	32/30.2	6.15	221	97.8	54	96.4	22	100.0	55	96.5	9	100.0	24	96	14	100.0	29	100.0	14	100.0
HPV14-10	Low Viral Load HPV16 (SiHa)	-	0.48	44	19.5	7	12.5	4	18.2	8	14.0	1	11.1	0	0	2	14.3	15	51.7	7	50.0
HPV14-08	HPV51&52 (clinical sample)	36.25	11.75	196	86.7	53	94.6	17	77.3	55	96.5	6	66.7	22	88	12	85.7	27	93.1	4	28.6
HPV14-04	HPV52&56 (clinical sample)	33.4	7.38	205	90.7	56	100.0	19	86.4	55	96.5	9	100.0	25	100	10	71.4	27	93.1	4	28.6
HPV14-07	HPV54&56 (clinical sample)	37.35	22.88	198	87.6	53	94.6	19	86.4	52	91.2	8	88.9	24	96	10	71.4	28	96.6	4	28.6
HPV14-03	HPV Negative (B5M)	-	0.44	222	98.2	54	96.4	22	100.0	57	100.0	9	100.0	25	100	14	100.0	27	93.1	14	100.0

I risultati sono suddivisi in base alla tecnologia utilizzata e **NON** suddivisi in base al sistema specifico

Sample code	Sample status	All technologies	Total		PCR				Hybrid <sup>a</sup> capture	DNA <sup>f</sup> array	LiPA <sup>g</sup>	Other <sup>h</sup>
					Conventional		Real time					
			n	%	Commercial <sup>c</sup>	In-house <sup>b</sup>	Commercial <sup>c</sup>	In-house <sup>b</sup>				

a: DDL diagnostic laboratory DNA ELISA kit HPV SPF10 version 1, RHA kit HPV SPF10-LiPA25, version 1 (n=1), Diagcor Bioscience GenoFlow HPV-HR Screening Test Kit (n=1), DIASSAY EIA KIT HPV GP HR (n=4), Diassay LMNX Genotyping Kit HPV GP (n=1), Master diagnostica HPV Direct Flow Chip Kit (n=1), Roche cobas 4800 HPV Test (n=46), Seegene Seeplex HPV4A ACE Screening (n=2).

b: Details not presented.

c: Abbott RealTime High Risk HPV (n=25), Amplison High Risk HPV - Genotype FBT (n=2), Bio Rad Di HR HPV Auto Array (n=2), Cobaid Yeast HPV (n=1)

**Suggerimento del Laboratorio:** Analizzare i dati analizzando le performance dei test utilizzati per lo screening separatamente rispetto a tutti gli altri.

d: Details not presented.

e: QIAGEN Digene High Risk HPV HC2 DNA test (n=20), QIAGEN Digene HPV HC2 DNA test (n=5).

f: Genomica CLART Human Papillomavirus 2 (n=5), Greiner bio-one PapilloCheck (n=8), Hybridio Human Papilloma GenoArray Test Kit (n=1).

g: AB ANALITICA srl AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS (n=1), Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (n=13), LBP RHA Kit HPV SPF10-LiPA25 (n=2), Roche Linear Array HPV Genotyping Test (n=13).

h: bioMerieux NucliSENS EasyQ HPV (n=2), Gen-Probe Aptima HPV Assay (n=7), Hologic Cervista HPV HR (n=5).

# Dicocare: Aspetti critici dei campioni

Il campione è liofilizzato per cui deve essere risospeso:

- ↓ -Possibile errore di ricostituzione del campione della VEQ
- ↓ diversa dalla modalità di processamento del campione di routine
- ↑ ogni laboratorio può scegliere in quale mezzo risospendere il campione, anche se vengono date delle indicazioni generali

# Dicocare: Analisi dei risultati

- 1) Le analisi sono elaborate in base alla concordanza tra i laboratori partecipanti
- 2) Le analisi sono suddivise per metodo

Es. se si testano i campioni con HR-HC2, riceveremo i risultati in base a:

1. HPV HR NO typing (confronto con tutti i metodi che no-typing, non elencano i metodi che hanno utilizzato nel confronto)
2. HR-HC2 (solo i laboratori che hanno utilizzato HR-HC2)
3. HR-HC2 RLU/CO (solo i laboratori che hanno utilizzato HR-HC2 e hanno indicato la ratio)



# Dicocere: Analisi dei risultati

- ★ Analisi dei risultati molto dettagliata:
  1. Media
  2. Mediana
  3. z-score (-2 and 2)
  4. Bias vs Mediana

.....Analisi suddivise in base alla metodologia, **ma** non viene allestita un'analisi approfondita sui sistemi manuali o automatici né sul processamento dei campioni se manuale o automatico

...**errori nella ricostituzione dei campioni** possono influenzare nettamente il confronto dei risultati tra laboratori

# Caratteristiche ideali delle VEQ per i test HPV di screening

1. I campioni da testare devono mimare fedelmente i campioni clinici :
  - **nella composizione** (es. Thin Prep per i laboratori che processano campioni in fase liquida, STM per chi utilizza questo tipo di materiale ecc.)
  - **nella quantità** (volume minimo per eseguire una determinazione senza dover ricorrere a modalità di processazione diverse da quelle utilizzate per i campioni)
2. Valutare le **performance cliniche** dei test e non le performance analitiche :
  - quindi attribuire punteggi adeguati in base alla **sensibilità e specificità clinica**
3. Confrontare i test HPV validati per lo screening:
  - tenendo conto delle **diverse metodologie** (es. Real Time PCR vs Ibridazione in soluzione)
  - e dei **diversi sistemi** utilizzati (es. Processazione mediante stazioni automatizzate o processazione manuale)
4. Analizzare non solo le performance qualitative (positivo e negativo), ma qual'ora possibile confrontare anche i risultati quantitativi

Non esistono VEQ con tutte queste caratteristiche, per cui l'obiettivo è quello di riuscire a creare delle VEQ adatte alla valutazione del test HPV di screening o dare indicazioni ai produttori affinché vengano incontro alle esigenze dello screening



Grazie per l'attenzione  
e.burroni@ispo.toscana.it