

Workshop pre-congressuale *GISCi*  
La qualità nel percorso dello screening cervicale  
Sessione PRIMO LIVELLO HPV

## Esperienze con Sistema Cobas 4800



**D.ssa Bulletti Simonetta**  
**Laboratorio Unico di Screening**  
**Azienda USL Umbria 1**

Obiettivo generale:

Tendere ad UNIFORMARE le tipologie di  
**Controllo di Qualità per il test HPV di Screening**

Test HPV-HR primari eseguiti con il **sistema Cobas 4800**  
in 8 Laboratori in Italia

Il sistema Cobas 4800 Human Papilloma Virus (HPV) è un test qualitativo in PCR real time per la rilevazione in vitro del DNA del Papilloma Virus Umano nei campioni cervicali.

Il test si basa sull'amplificazione del DNA target mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e sull'ibridazione dell'acido nucleico.

Il test identifica in modo specifico i tipi ad alto rischio HPV 16 e HPV 18 e contemporaneamente i restanti 12 tipi ad alto rischio (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68).

I campioni sono prelevati, conservati e trasportati nei vial:

- Cobas PCR Cell Collection Media (Roche Molecular System)
- Preservcyt Solution (Hologic e Corp.)
- Surepath Preservative Fluid (BD Diagnostics-Tripath)

# Il sistema Cobas 4800

## Cobas x 4800:



-esegue la preparazione dei campioni da tubi primari e secondari

-estrae simultaneamente il DNA dell'HPV e della  $\beta$ -globina

-prepara in automazione la piastra per la PCR

# Il sistema Cobas 4800

## Cobas z 4800:

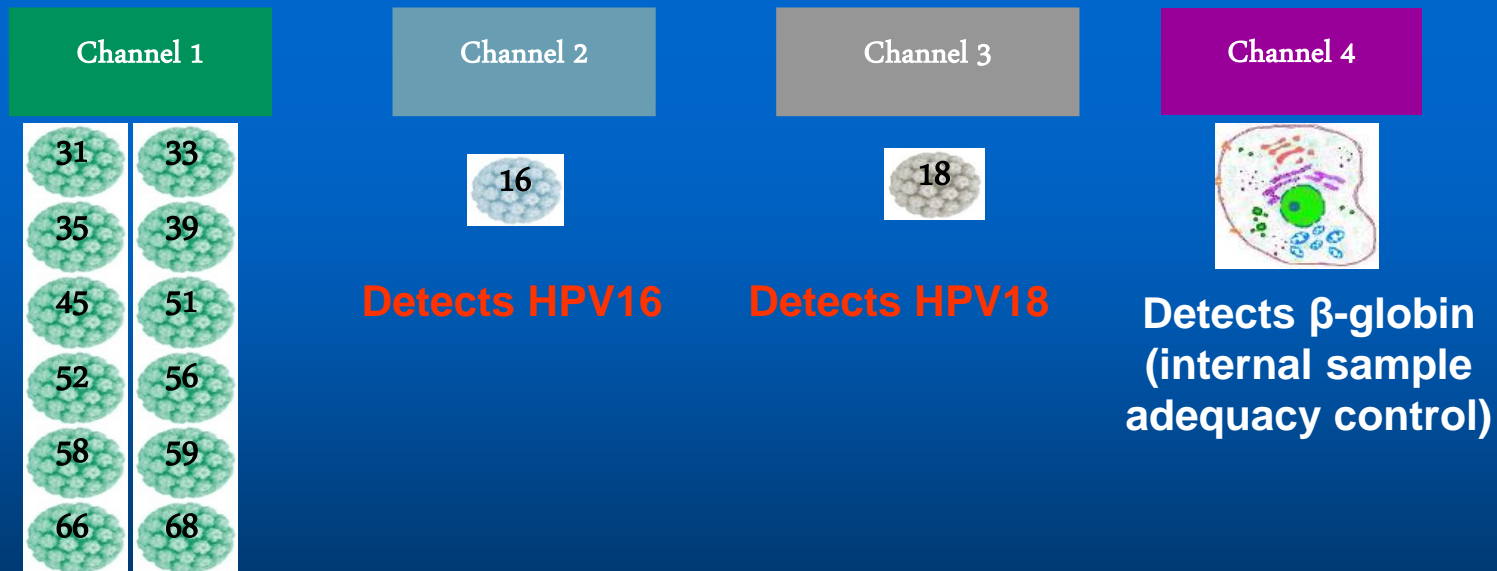


- amplifica in PCR le sequenze di DNA target (200 nucleotidi di L1) tramite l'uso di coppie complementari di primers specifici per l'HPV e la  $\beta$ -globina;
- mediante estrazione, amplificazione e rivelazione simultanea della  $\beta$ -globina è possibile monitorare l'intero processo;
- rivela in REAL-TIME multiplex con sonde oligonucleotidiche fluorescenti, specifiche per HPV 16, HPV 18, HPV Altri e  $\beta$ -globina.

# Il sistema Cobas 4800

La rilevazione del DNA amplificato (amplicone) avviene per mezzo di sonde oligonucleotidiche marcate con 4 diversi fluorocromi (HPV 16, HPV 18, HPV Altri e  $\beta$ -globina)

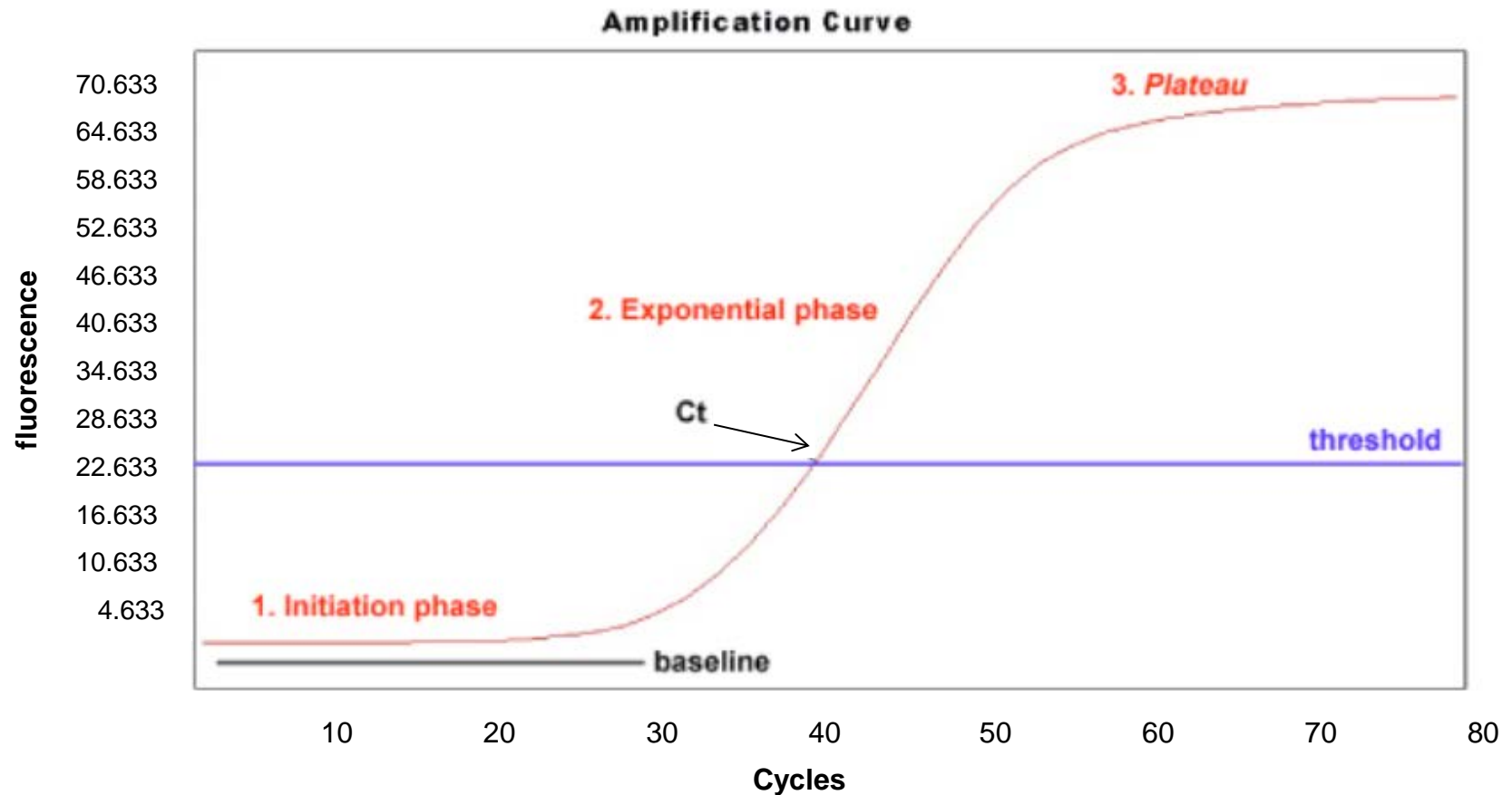
- Il segnale amplificato dei 12 tipi (Altri) di HPV può essere rilevato usando uno stesso fluorocromo, mentre i segnali dei tipi HPV 16, HPV 18 e  $\beta$ -globina vengono rilevati con un fluorocromo specifico.



12 hrHPV genotypes  
as a pooled result

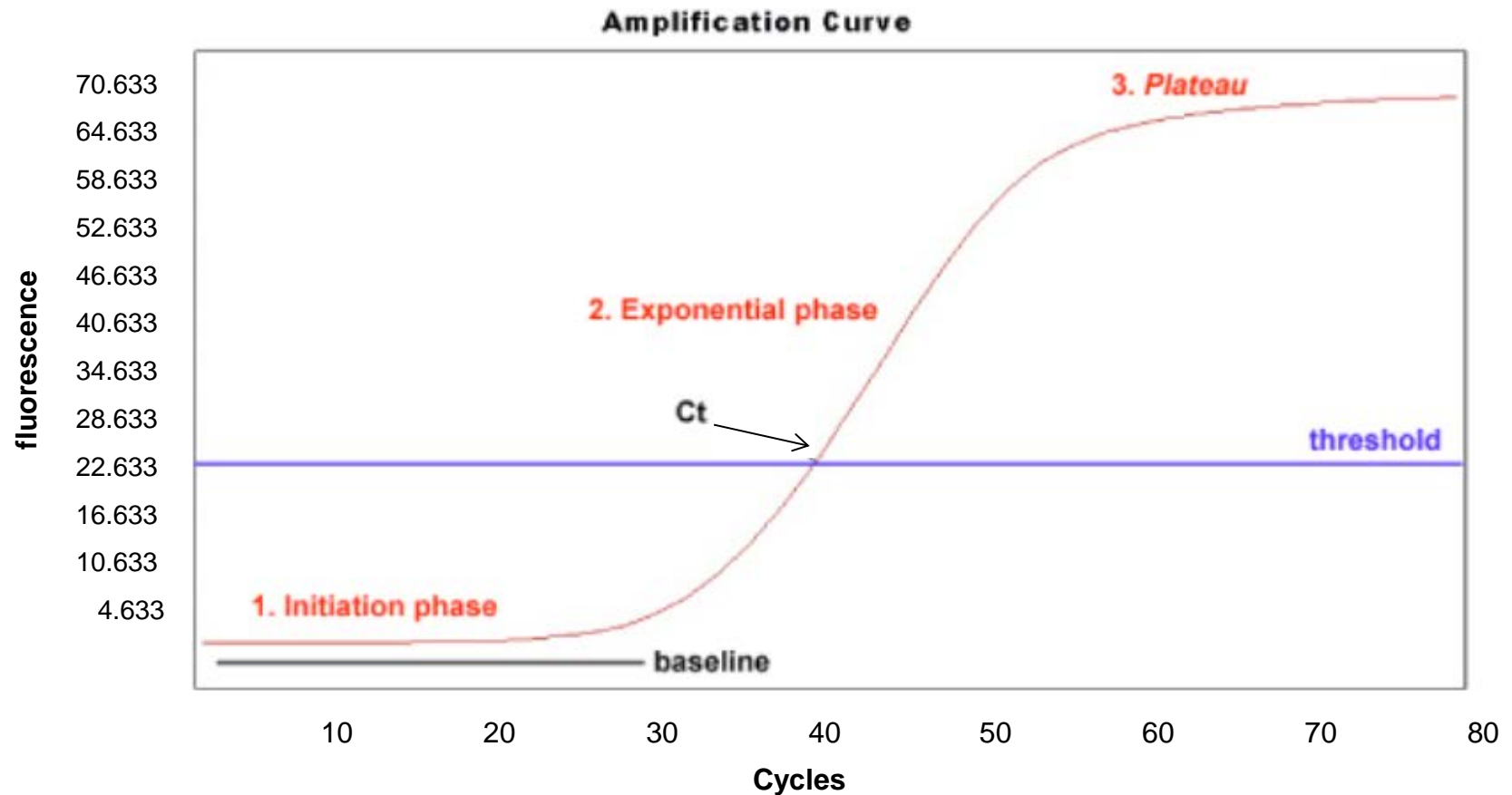
# Il sistema Cobas 4800

- In ogni seduta viene incluso un set di controlli positivi e negativi. E' necessario ottenere risultati validi per entrambi i controlli affinché il software possa visualizzare i risultati refertabili del test relativamente alla seduta.
- Il software gestisce i calcoli interpretando le curve di amplificazione mediante un algoritmo appositamente sviluppato e calcola automaticamente i risultati eliminando l'interpretazione manuale



Real Time PCR. Nei primi cicli di amplificazione la variazione del segnale della fluorescenza non è misurabile: **baseline della curva**. Un aumento della fluorescenza oltre la linea di base indica l'accumulo di amplificato. La **linea-soglia (threshold)** caratteristica di ciascuna applicazione, interseca la curva dei campioni nella fase esponenziale





La curva di amplificazione del campione taglia la linea soglia in un punto chiamato **ciclo soglia (CT)**, definito come il numero del ciclo in cui la curva di amplificazione taglia la linea-soglia

Il numero del ciclo  $CT > 41$ : HPV-DNAhr test **NEGATIVO**

$CT < 39-40$ : HPV-DNAhr test **POSITIVO**

## Ringrazio i laboratori che ci hanno fornito i dati:

- 1) Ferrara - Azienda Ospedaliera-Universitaria
- 2) Firenze - Laboratorio Regionale di Prevenzione Oncologica
- 3) Padova - Istituto Oncologico Veneto
- 4) Perugia - Laboratorio Unico di Screening
- 5) Pieve Sestina - AUSL Romagna
- 6) Reggio Emilia - Laboratorio Unico Area Vasta Emilia nord
- 7) Roma - Microbiologia e Virologia Ospedale Sandro Pertini \*
- 8) Treviso - Ca Foncello

<b>Anno riferimento</b>	<b>xxxx</b> (anziché a 2016 o 2017)						
<b>Regione</b>			<b>Sede lab test HPV</b>				
<b>DATI GENERALI</b>							
sistema analitico							
	N	%					
N piattaforme in uso							
N test totali nell'anno							
N HPV pos							
N vicini al cut off pos			<i>per test HC2 considerare ratio 1-2.5; per test PCR ct 39-40 (chi ha il dato)</i>				
N vicini al cut off neg			<i>per test HC2 considerare ratio 0.90-0.99; per test PCR ct 4 (chi ha il dato)</i>				
N campioni inadeguati							
N campioni invalidati							
N campioni non valutabili per controllo interno neg							
N piastre invalidate/totale							
N test medio/mese							
N unità personale dedicato							
<b>CONTROLLI QUALITA' INTERNI (QCI) ed ESTERNI (QCE)</b>	utilizzo 1= si 2= mai 3= a volte	Frequenza 1= ogni run 2= ogni 3 mesi 3= ogni 6 mesi 4= ogni 12 mesi	come preparati 1= DNA sintetici (ditta) 2= rip da run precedente 3= pool 4= cellule in sosp (ditta) 5= non usati	media (se applicabile)	dev st (se applicabile)	registrazione dati 1= automatico (sw produttore kit) 2= manuale	uso carte dei controlli 1= ogni mese 2= ogni 6 ms 3= ogni 12 ms 4= mai
QCI neg inclusi nel kit							
QCI pos inclusi nel kit							
QCI preparati dal lab							
QC parte terza							
				accuratezza N concordanti/Tot	accuratezza %		
QCE (scambio tra laboratori)							
<b>VALIDAZIONE ESTERNA (VEQ)</b>	utilizzo 1= si 2= no	FREQUENZA 1= 1 programma 2= 2 o più progr.	Programma 1 (Nome e produttore)	Programma 1 (Nome e produttore)	Programma 1 (Nome e produttore)		
VEQ							

<b>Anno riferimento</b>	<b>XXXX</b> (da 2016 a 2017)						
<b>Regione</b>			<b>Sede lab test HPV</b>				
<b>DATI GENERALI</b>							
sistema analitico							
	N	%					
N piattaforme in uso							
N test totali nell'anno							
N HPV pos							
N vicini al cut off pos			<i>per test HC2 considerare ratio 1-2,5; per test PCR ct 33-40 (chi ha il dato)</i>				
N vicini al cut off neg			<i>per test HC2 considerare ratio 0,30-0,33; per test PCR ct 41 (chi ha il dato)</i>				
N campioni inadeguati							
N campioni invalidati							
N campioni non valutabili per controllo interno neg							
N piastre invalidate/totale							
N test medio/mese							
N unità personale dedicato							

	LABORATORI								
	1	2	3	4	5	6	7	8	totale
N piattaforme in uso	2	4+4+2	2	2	2	3		2	23
N test totali nell'anno	34.845	67.317	40.761	33.108	36.356	70.418		70.615	353.420
N HPV pos	1.926	5.266	3.219	2.323	2.267	4.114		4.120	23.235 6,6%
N vicini al cut off pos		373			172				545
N vicini al cut off neg									
N campioni inadeguati	43	2	85	139 (2° volta)	2	8		86	
N campioni invalidati		/	41			196		41	
N campioni non valutabili per controllo interno neg		25	18 (2° volta)		49	94		35	
N piastre invalidate/totale	12/413	6/829	3/491		10 (primario e non)	13/820		22/801	
N test medio/mese	3.199	6.120	3.397	2.759	3.000	6.359		5.880	
N unità personale dedicato	1	4, 5	2	1,5	2	3,5		2	

	LABORATORI								
	1	2	3	4	5	6	7	8	totale
N piattaforme in uso	2	4+4+2	2	2	2	3		2	23
N test totali nell'anno	34.845	67.317	40.761	33.108	36.356	70.418		70.615	353.420
N HPV pos	1.926	5.266	3.219	2.323	2.267	4.114		4.120	23.235 6,6%
N vicini al cut off pos		373			172				545
N vicini al cut off neg									
N campioni inadeguati	43	2	85	139 (2° volta)	2	8		86	
N campioni invalidati		/	41			196		41	
N campioni non valutabili per controllo interno neg		25	18 (2° volta)		49	94		35	
N piastre invalidate/totale	12/413	6/829	3/491		10 (primario e non)	13/820		22/801	
N test medio/mese	3.199	6.120	3.397	2.759	3.000	6.359		5.880	
N unità personale dedicato	1	4,5	2	1,5	2	3,5		2	

Tot. 864 (0,2%)

Le prestazioni di laboratorio si contraddistinguono in 3 fasi:

- Pre-analitica
- Analitica
- Post-analitica

Il monitoraggio della fase analitica prevede 2 specifici macro-processi:

- Controllo di Qualità Interno (CQI) misura della precisione
- Validazione Esterna di Qualità (VEQ) misura dell'accuratezza

L'integrazione tra il CQI e VEQ è la condizione indispensabile per la valutazione della qualità delle prestazioni di un laboratorio

# Controllo di Qualità Interno

*CQI* : Serve a valutare la **PRECISIONE** dei dati del Laboratorio attraverso la ripetibilità dei valori dello stesso controllo sulla stessa apparecchiatura.

L'esecuzione del *CQI* rappresenta un metodo di monitoraggio dell'errore ed è l'unico sistema che permette ai laboratori di conoscere e contenere l'errore presente nelle loro misure in tempo reale.



# Controllo di Qualità Interno neg/pos incluso nel kit (tutti i laboratori)

CONTROLLI QUALITA' INTERNI (QCI) ed ESTERNI (QCE)	utilizzo 1= si 2= mai 3= a volte	Frequenza 1= ogni run 2= ogni 3 mesi 3= ogni 6 mesi 4= ogni 12 mesi	come preparati 1= DNA sintetici (ditta) 2= rip da run precedente 3= pool 4= cellule in sosp (ditta) 5= non usati	media (se applicabile)	dev st (se applicabile)	registrazione dati 1= automatico (sw produttore kit) 2= manuale	uso carte dei controlli 1= ogni mese 2= ogni 6 ms 3= ogni 12 ms 4= mai
QCI neg inclusi nel kit							
QCI pos inclusi nel kit							
QCI preparati dal lab							
QC parte terza							
				accuratezza N concordanti/Tot	accuratezza %		
QCE (scambio tra laboratori)							



# Controllo di Qualità Interno neg/pos incluso nel kit (tutti i laboratori)

<b>CONTROLLI QUALITA' INTERNI (QCI) ed ESTERNI (QCE)</b>	utilizzo 1= si 2= mai 3= a volte	Frequenza 1= ogni run 2= ogni 3 mesi 3= ogni 6 mesi 4= ogni 12 mesi	come preparati 1= DNA sintetici (ditta) 2= rip da run precedente 3= pool 4= cellule in sosp (ditta) 5= non usati	media (se applicabile)	dev st (se applicabile)	registrazione dati 1= automatico (sw produttore kit) 2= manuale	uso carte dei controlli 1= ogni mese 2= ogni 6 ms 3= ogni 12 ms 4= mai 5=ogni giorno
QCI neg inclusi nel kit	1	1	1	lab 2,3,8	lab 2,3,8	1: lab 1,4,5,6,7 2: lab 3,8 2 software dedicato: lab 2	1: lab 3,5 3: lab 1 4: lab 4,6,7,8 5: lab 2
QCI pos inclusi nel kit							

## Controllo di Qualità Interno neg/pos incluso nel kit (tutti i laboratori)

Laboratori	2		3		8	
	media	dev st	media	dev st	media	dev st
ct $\beta$ -globina	36,3	0,58			36,2	0,62
ct HR	37,4	0,44			37,6	0,78
ct 16	37,7	0,54			38,7	0,80
ct 18	38,4	0,57			36,2	0,66
MEDIA	37,4	0,5	38	0,7	37	0,7

# Controllo di Qualità Interno preparato dal laboratorio (lab 2,3,7)

<b>CONTROLLI QUALITA' INTERNI (QCI) ed ESTERNI (QCE)</b>	utilizzo 1= si 2= mai 3= a volte	Frequenza 1= ogni run 2= ogni 3 mesi 3= ogni 6 mesi 4= ogni 12 mesi	come preparati 1= DNA sintetici (ditta) 2= rip da run precedente 3= pool 4= cellule in sosp (ditta) 5= non usati	media (se applicabile)	dev st (se applicabile)	registrazione dati 1= automatico (sw produttore kit) 2= manuale	uso carte dei controlli 1= ogni mese 2= ogni 6 ms 3= ogni 12 ms 4= mai
QCI neg inclusi nel kit							
QCI pos inclusi nel kit							
QCI preparati dal lab							
QC parte terza							
				accuratezza N concordanti/Tot	accuratezza %		
QCE (scambio tra laboratori)							



# Controllo di Qualità Interno preparato dal laboratorio (lab 2,3,7)

<b>CONTROLLI QUALITA' INTERNI (QCI) ed ESTERNI (QCE)</b>	utilizzo 1= si 2= mai 3= a volte	Frequenza 1= ogni run 2= ogni 3 mesi 3= ogni 6 mesi 4= ogni 12 mesi	come preparati 1= DNA sintetici (ditta) 2= rip da run precedente 3= pool 4= cellule in sosp (ditta) 5= non usati	media (se applicabile)	dev st (se applicabile)	registrazione dati 1= automatico (sw produttore kit) 2= manuale	uso carte dei controlli 1= ogni mese 2= ogni 6 ms 3= ogni 12 ms 4= mai 5=ogni giorno
QCI preparati dal lab	1: lab 2,3,7	1: lab 2,3 7	2: lab 7 3: lab 2,3	lab 2,3	lab 2,3	1: lab 7 2: lab 3 2 software dedicato: lab 2	1: lab 3 4: lab 7 5: lab 2

## Controllo di Qualità Interno preparato dal laboratorio (lab 2,3)

Laboratori	2				3	
	pool 12		pool 13			
	media	dev st	media	dev st	media	dev st
ct $\beta$ -globina	26,6	0,73	26,9	1,03		
ct HR	26,9	1,11	27,9	1,56		
ct 16	27,4	1,01	27,1	1,14		
ct 18	29	0,98	29,5	1,62		
MEDIA	27,5	0,96	27.8	1,34	31,7	0,9

# Controllo di Qualità parte terza (lab. 1,2,5,6)

<b>CONTROLLI QUALITA' INTERNI (QCI) ed ESTERNI (QCE)</b>	utilizzo 1= si 2= mai 3= a volte	Frequenza 1= ogni run 2= ogni 3 mesi 3= ogni 6 mesi 4= ogni 12 mesi	come preparati 1= DNA sintetici (ditta) 2= rip da run precedente 3= pool 4= cellule in sosp (ditta) 5= non usati	media (se applicabile)	dev st (se applicabile)	registrazione dati 1= automatico (sw produttore kit) 2= manuale	uso carte dei controlli 1= ogni mese 2= ogni 6 ms 3= ogni 12 ms 4= mai
QCI neg inclusi nel kit							
QCI pos inclusi nel kit							
QCI preparati dal lab							
QC parte terza							
				accuratezza N concordanti/Tot	accuratezza %		
QCE (scambio tra laboratori)							



# Controllo di Qualità parte terza (lab. 1,2,5,6)

CONTROLLI QUALITA' INTERNI (QCI) ed ESTERNI (QCE)	utilizzo 1= si 2= mai 3= a volte	Frequenza 1= ogni run 2= ogni 3 mesi 3= ogni 6 mesi 4= ogni 12 mesi 5= ogni giorno	come preparati 1= DNA sintetici (ditta) 2= rip da run precedente 3= pool 4= cellule in sosp (ditta) 5= non usati	media (se applicabile)	dev st (se applicabile)	registrazione dati 1= automatico (sw produttore kit) 2= manuale	uso carte dei controlli 1= ogni mese 2= ogni 6 ms 3= ogni 12 ms 4= mai 5=ogni giorno
QC parte terza	1: lab 1,2,5,6	1: lab 1,5,6 5: lab 2	1: lab 1,2,5 4: lab 6	lab 2,5	lab 2,5	1: lab 6 2: lab 1, 5, 2 software dedicato: lab 2	1: lab 5 3: lab1 4: lab 6 5: lab 2



## Controllo di Qualità parte terza (lab. 1,2,5,6)

Laboratori	2		5	
	media	dev st	media	dev st
ct $\beta$ -globina	30,16	1,6		
ct Altri	/	/		
ct 16	31,38	1,7		
ct 18	/	/		
MEDIA	30,8	1,65	35,9	1,34

## QCE- scambio tra laboratori (lab. 3,8)

<b>CONTROLLI QUALITA' INTERNI (QCI) ed ESTERNI (QCE)</b>	utilizzo 1= si 2= mai 3= a volte	Frequenza 1= ogni run 2= ogni 3 mesi 3= ogni 6 mesi 4= ogni 12 mesi	come preparati 1= DNA sintetici (ditta) 2= rip da run precedente 3= pool 4= cellule in sosp (ditta) 5= non usati	media (se applicabile)	dev st (se applicabile)	registrazione dati 1= automatico (sw produttore kit) 2= manuale	uso carte dei controlli 1= ogni mese 2= ogni 6 ms 3= ogni 12 ms 4= mai
QCI neg inclusi nel kit							
QCI pos inclusi nel kit							
QCI preparati dal lab							
QC parte terza							
				accuratezza N concordanti/Tot	accuratezza %		
→ QCE (scambio tra laboratori)							

## QCE- scambio tra laboratori (lab. 3,8)

<b>CONTROLLI QUALITA' INTERNI (QCI) ed ESTERNI (QCE)</b>	utilizzo 1= si 2= mai 3= a volte	Frequenza 1= ogni run 2= ogni 3 mesi 3= ogni 6 mesi 4= ogni 12 mesi	come preparati 1= DNA sintetici (ditta) 2= rip da run precedente 3= pool 4= cellule in sosp (ditta) 5= non usati	accuratezza N concordanti/Tot	accuratezza %	registrazione dati 1= automatico (sw produttore kit) 2= manuale	uso carte dei controlli 1= ogni mese 2= ogni 6 ms 3= ogni 12 ms 4= mai
QCE (scambio tra laboratori)	1: lab 3,8			lab 3: 12/12 (4 campioni per 3 laboratori) lab 8: 28/28 (usati settimanalmente fino ad esaurimento)	100%	2: lab 3, 8	3: lab 3 4: lab 8

Laboratori	CQI neg/pos incluso nel kit	CQI preparato dal laboratorio	CQ parte terza	CQE scambio tra laboratori
1	<input checked="" type="radio"/>		<input checked="" type="radio"/>	
2	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
3	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>		<input checked="" type="radio"/>
4	<input checked="" type="radio"/>			
5	<input checked="" type="radio"/>		<input checked="" type="radio"/>	
6	<input checked="" type="radio"/>		<input checked="" type="radio"/>	
7	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>		
8	<input checked="" type="radio"/>			<input checked="" type="radio"/>

# Validazione Esterna di Qualità (VEQ)

Partecipare a programmi di VEQ rappresenta un esercizio che incrementa la qualità analitica dei risultati espressi dai laboratori

i programmi prevedono la gestione da parte di un ente organizzatore, un provider, esterno ai laboratori

Il provider prevede di inviare ai laboratori il materiale di controllo, che simula il materiale biologico dei pazienti, su cui dovranno essere eseguite le determinazioni analitiche che saranno poi valutate dal provider in base ai risultati attesi (analisi a gruppi per strumentazione e per metodica)

SCOPO della VEQ è quello di fornire informazioni che permettono al laboratorio partecipante una valutazione sulle proprie performance analitiche ed il confronto con quelle eseguite dagli altri laboratori partecipanti al programma (stessa per strumentazione e metodica)

# Validazione Esterna di Qualità (VEQ)

<b>VALIDAZIONE ESTERNA (VEQ)</b>	utilizzo 1= si 2= no	FREQUENZA 1= 1 programma 2= 2 o più progr.	Programma 1 (Nome e produttore)	Programma 1 (Nome e produttore)	Programma 1 (Nome e produttore)
VEQ					



# Validazione Esterna di Qualità (VEQ)

Laboratori	VEQ Azienda Ospedaliera CAREGGI	UK NEQAS	INSTAND EXTERNAL QUALITY	Quality Control Molecular Diagnostics	DICO - CARE	VEQ- RT
1	★	★	★			
2	★	★		★	★	★
3	★			★	★	
4	★	★			★	
5	★	★	★			
6	★	★	★			
7		★				
8	★			★		

# CONCLUSIONI

- Obiettivo generale è quello di tendere ad uniformare le tipologie di controllo di qualità per il test HPV di screening
- Nello screening è di fondamentale importanza determinare le infezioni da HPV clinicamente rilevanti perché il test HPV-hr rappresenta un test di rischio oncogeno, non un test virale
- I test HPV di screening devono valutare le performance cliniche e non le performance analitiche

....non si può parlare di conclusioni ma di una partenza....

verso controlli di qualità specifici per test HPV di screening .....

Quali test di controllo di qualità sono performanti per i controlli di HPV-DNA di screening?



